

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

VARIABILIDADE GENÉTICA E BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO DIABETES
GESTACIONAL

CURITIBA
2014

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS

VARIABILIDADE GENÉTICA E BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO DIABETES
GESTACIONAL

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador:
Prof. Dr. Geraldo Picheth

Coorientadores:
Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Prof. Dr. Philippe Gillery

CURITIBA

2014

Weiss, Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos

Variabilidade genética e biomarcadores associados ao diabetes gestacional / Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos – Curitiba, 2014.
198 f. : il (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientador: Professor Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Coorientador: Professor Dr. Philippe Gillery

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Diabetes gestacional. 2. SNP. 3. Variações genéticas. 4. Produtos de glicação avançada (AGEs). 5. Log (TG/HDL-C). I. Picheth, Geraldo. II. Souza, Emanuel Maltempi. III. Gillery, Philippe. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS-WEISS

Título: "Variabilidade genética e biomarcadores associados ao diabetes gestacional"

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Prof. Dr. Geraldo Picheth
Orientador

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
Co-orientador

Profª. Drª. Katia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª. Drª. Sabrina Grassioli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Universidade Federal do Paraná

Profª. Drª. Karin Braun-Prado
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 19 de março de 2014.

Dedico este trabalho aos pilares da minha vida por quem tenho imenso amor, meus pais Eli Izabel Santos e Alceu Santos Sob^o. e meu esposo Vinícius A. Weiss.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu Deus que me conduziu até aqui. Graças à Ele tive forças, motivação e coragem para enfrentar os obstáculos e as dificuldades que apareceram em meu caminho. Dou graças pelas oportunidades que me concedes todos os dias e pelas pessoas especiais que coloca em minha vida.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade concedida.

Agradeço ao REUNI e à CAPES e pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento durante o período de estágio na França.

Agradeço imensamente ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Geraldo Picheth. Obrigada pela oportunidade de termos trabalhado juntos nestes 6 anos, pela orientação em diversos momentos e situações, por acreditar em mim e por ter se tornado alguém tão especial na minha vida.

Agradeço ao Prof. Dr. Emanuel M. de Souza pela colaboração neste trabalho, pelas ideias e sugestões e por sua disponibilidade sempre em nos auxiliar.

Agradeço de maneira especial ao Prof. Dr. Philippe Gillery (Reims, França) pelo aceite na coorientação deste trabalho e por ter aberto as portas do seu laboratório para mim. Muito obrigada por toda a ajuda prestada durante o meu estágio científico na França. Foi uma experiência única de grande crescimento profissional e pessoal.

Agradeço ao Dr. Stéphane Jaisson por ter sido tão generoso comigo e ter se tornado um amigo. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e pela gentileza com que sempre me tratou. Obrigada pela companhia nos almoços diários, pelas conversas e pelo apoio durante minha estadia na França.

Agradeço de maneira especial à Nathalie Leroy e à Catherine Desrosches. Sem o auxílio de vocês as dosagens não seriam possíveis. Vocês são pessoas especiais, amigas para a vida toda que carregarei sempre no coração.

Agradeço à Dra. Marcelle Tonye e à Dra. Nathalie Schneider pelo apoio, pela convivência, pelos passeios e pela oportunidade de tê-las conhecido.

Agradeço à Dra. Rosângela Réa pela coleta das amostras das gestantes diabéticas e por todo carinho e disposição em ajudar que sempre teve comigo.

Agradeço às professoras Dr^{as}. Fabiane Gomes de Moraes Rego, Dayane Alberton e Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth pelo convívio diário, pelas conversas e por todo apoio científico e pessoal.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelas conversas, discussões e por todos os momentos compartilhados.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em avaliar este trabalho, pelas críticas e sugestões que com certeza tornaram este trabalho melhor.

Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiaram e que fazem parte da minha vida, em todos os momentos. Obrigada pelas conversas, pela descontração e pelo carinho sincero.

Agradeço à minha família, a família que Deus escolheu para mim, por quem tenho grande amor, respeito e zelo. Obrigada pelas orações, pelo apoio e amor incondicional. Agradeço em especial à minha vózinha “Choca” (*in memoriam*) que me ensinou a estar sempre pertinho da família, a ter fé em Deus e a persistir, sempre... a Sra. me faz muita falta...

Às pessoas que mais amo nesta vida, o que dizer?! Só tenho a agradecer, agradecer e agradecer por tudo o que fazem por mim, por tudo o que me ensinaram, pelos valores e princípios passados, pelo apoio, pelo amor, pelas orações constantes e por estarmos sempre juntos, não importando a distância. Amo vocês meus pais queridos, Eli Izabel e Alceu, meus amigos, meus exemplos!!! Obrigada pelo incentivo, pelas palavras de ânimo e por acreditarem em mim. Serei sempre grata por tudo. A conclusão de mais esta etapa não seria possível sem vocês.

Tenho plena certeza de que Deus coloca pessoas certas nas nossas vidas e Ele colocou o Vinícius na minha. Meu amor, obrigada pela família que temos juntos e pela história que estamos escrevendo. Sou muito feliz em ter você como meu companheiro, meu amigo, meu parceiro, meu incentivador. Obrigada por cada momento, por cada palavra, por cada abraço, por me dar força e amparo em todos os momentos. Meu amor por você é incondicional.

Os 4 anos deste doutorado foram marcados por grandes acontecimentos na minha vida pessoal e profissional. Foram anos de realizações, de crescimento e de oportunidades. Sou grata à Deus por cada um dos momentos vividos e pelas experiências adquiridas, tenho certeza de que tudo isso foi fundamental para que eu me tornasse hoje uma pessoa e profissional melhor.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

O *diabetes mellitus* gestacional (diabetes gestacional, DMG) é definido como a intolerância à glucose diagnosticada durante a gestação e que claramente não é diabetes prévio ou manifesto. No Brasil afeta cerca de 4-7% das gestações sendo fator predisponente para o aumento da morbidade na gestante, feto e neonato. O objetivo do trabalho foi associar a variabilidade genética de sítios polimórficos A3243G do mtDNA, rs10885122 do gene *ADRA2A*, rs2237892 do gene *KCNQ1*, rs1801282 do gene *PPARg*, rs5393 do gene *SLC2A2* e rs3758947 do gene *ABCC8* com o diabetes gestacional, bem como buscar biomarcadores para a patologia. A amostra foi composta de 814 gestantes (89,7% Euro-Brasileiras), classificadas em gestantes saudáveis (CTRL, n=506) e portadoras de diabetes gestacional (DMG, n=308). O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos do HC-UFPR (CEP/SD: 927.052.10.05 e CAAE: 1924.0.000.091-10). As gestantes do grupo DMG apresentaram (mediana) idade (32 vs 26 anos, $P<0,001$) e IMC (32 vs 24 kg/m²) significativamente maiores em relação ao grupo controle. A glicemia em jejum foi significativamente diferente entre os grupos DMG e controle (93 vs 82 mg/dL, $P<0,001$) e a concentração média de HbA1C no grupo DMG (5,6%) sugere um grupo com bom controle glicêmico. O único parâmetro avaliado que não apresentou diferença significativa entre os grupos foi o HDL-C ($P=0,596$). As genotipagens foram realizadas com sondas fluorescentes (sistema TaqMan) ou PCR-RFLP (mtDNA). As variantes estudadas se encontraram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foram associadas ao *diabetes mellitus* gestacional na população sul-Brasileira avaliada. Uma associação entre o índice de massa corpórea (IMC) e a variante rs10885122 do gene *ADRA2A* foi encontrada no DMG, evidenciando que portadoras do alelo T (GT+TT) apresentaram um incremento em média de 2,03 kg/m² quando comparadas a homozigotos GG. Gestantes saudáveis portadoras do alelo G da variante rs1801282 do gene *PPARg* (genótipos CG + GG; Pro/Ala + Ala/Ala) apresentaram um aumento significativo ($P=0,003$) no IMC, de 2,2 kg/m² em média, quando comparadas aos homozigotos CC (Pro/Pro). Gestantes diabéticas portadoras da presença do alelo G (genótipos CG + GG; Pro/Ala+Ala/Ala) apresentaram concentrações séricas maiores de HDL-C em relação às portadoras do alelo C (genótipo CC; Pro/Pro). Gestantes com diabetes gestacional portadoras da presença do alelo T (genótipos CT+TT) do polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8* apresentaram um aumento na concentração sérica do 1,5 anidroglicitol quando comparadas às portadoras do genótipo CC, sugerindo melhor controle glicêmico. As concentrações séricas dos produtos de glicação avançada (AGEs), carboximetilisina e pentosidina, quantificadas por LC-MS/MS, são significativamente maiores ($P<0,05$) em gestantes diabéticas quando comparadas às saudáveis. O índice aterogênico do plasma calculado pelo Log(TG/HDL-C) permitiu a identificação de mulheres com baixo risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* gestacional antes das 24 semanas de gestação. Gestantes com Log(TG/HDL-C) menor que 0,454 antes da 24ª semana de gestação, apresentam risco menor para o *diabetes mellitus* gestacional, sendo este parâmetro sugerido para a triagem do DMG.

Palavras-chave: diabetes gestacional, mtDNA, *ADRA2A*, *KCNQ1*, *PPARg*, *SLC2A2*, *ABCC8*, CML, MG-H1, pentosidina, Log(TG/HDL-C), SNP, variações genéticas.

ABSTRACT

Gestational diabetes mellitus (gestational diabetes, GDM) is defined as glucose intolerance diagnosed in pregnancy and that is not overt diabetes. The frequency of GDM in the Brazilian population is between 4-7% of pregnancies. The objective of this study, was to associate the genetic variability of polymorphic sites A3243G of mtDNA, rs10885122 of *ADRA2A* gene, rs2237892 of *KCNQ1* gene, rs1801282 of *PPARg* gene, rs5393 of *SLC2A2* gene and rs3758947 of *ABCC8* gene with gestational diabetes and investigate for association between laboratorial parameters and the disease. The sample consisted of 814 women (89,7% Euro-Brazilian), classified as healthy (control group, n = 506) and patients with gestational diabetes (GDM group, n = 308). The project was approved by the Ethics in Human Research of the HC-UFPR (CEP / SD: 927.052.10.05 and CAAE: 1924.0.000.091-10). Women in the GDM group had a median age higher than the controls (32 vs 26 years, $P < 0,001$) and higher body mass index (BMI) (32 vs 24 kg/m²). Fasting glucose was different between GDM and control group (93 vs 82 mg/dL, $P < 0,001$) and mean HbA1C concentration (5,6%) in GDM group suggests a group with a good glycemic control. Only HDL-C was not different between the groups ($P = 0,596$). The genotyping was performed with fluorescent probes (TaqMan system) or with PCR-RFLP (mtDNA). The studied variants were in the Hardy-Weinberg equilibrium and were not associated with gestational *diabetes mellitus* in the South Brazilian population. An association between pregnant women with GDM and BMI were found. Carriers of T allele (GT+TT) of *ADRA2A* gene have higher BMI (2,03kg/m²) than those carriers of G allele. Health pregnant women carrier of G allele (CG+GG; Pro/Ala+Ala/Ala) of *PPARg* gene have higher BMI (2,2kg/m²) than those women carrier of C allele (CC; Pro/Pro; $P = 0,003$). For the same SNP, pregnant women with GDM and carrying G (CG+GG; Pro/Ala+Ala/Ala) allele have higher HDL-C levels than those carrying C allele (CC; Pro/Pro). For the *ABCC8* gene, pregnant women with GDM have higher concentration of 1,5 anhydroglucitol when carrying T allele (CT+TT) than those carrying C allele (CC). This fact suggests that these women have better glycemic control. Serum concentration of advanced glycation end products (AGEs), carboxymethyllysine and pentosidina, quantified by LC-MS/MS, are higher in GDM group ($P < 0,05$) when compared with health pregnant women. The atherogenic index of plasma (AIP), calculated as $\text{Log}(\text{TG}/\text{HDL-C})$, is a valuable index to identify pregnant women with low risk of gestational diabetes before the 24th week of pregnancy. Pregnant women with AIP bellow 0,454 have low probability of gestational diabetes mellitus in early pregnancy (before 24th week of pregnancy). This index could help the screening for GDM.

Key-words: gestational diabetes, mtDNA, *ADRA2A*, *KCNQ1*, *PPARg*, *SLC2A2*, *ABCC8*, CML, MG-H1, pentosidine, $\text{Log}(\text{TG}/\text{HDI-C})$, SNP, genetic variations.

RÉSUMÉ

Le diabète gestationnel (DMG) est défini comme une intolérance au glucose diagnostiquée pendant la grossesse sans antécédents de diabète. Au Brésil, le DMG concerne environ 4-7% des grossesses et constitue un facteur prédisposant à une augmentation de la morbidité chez les femmes enceintes, les fœtus et les nouveau-nés. L'objectif de cette étude était d'associer la variabilité génétique des sites polymorphes A3243G du mtDNA, le rs10885122 du gène *ADRA2A*, rs2237892 du gène *KCNQ1*, rs1801282 du gène *PPARg*, rs5393 de gène *SLC2A2* et rs3758947 du gène *ABCC8* avec le diabète gestationnel et de rechercher des biomarqueurs pour la pathologie. L'échantillon était composé de 814 femmes (89,7 % Euro - brésiliens), dont 506 femmes enceintes en bonne santé (CTRL) et 308 femmes présentant un diabète gestationnel (DMG). Le projet a été approuvé par le Comité d'éthique de l'HC- UFPR (CEP / SD : 927.052.10.05 et CAAE : 1924.0.000.091-10). Les femmes du groupe DMG ont un âge médian (32 vs 26 ans, $p < 0,001$) et d'indice médian de masse corporelle (IMC) (32 vs 24 kg/m²) plus élevés que pour le groupe CTRL. La glycémie à jeun était significativement différente entre les groupes DMG et CTRL (93 vs 82 mg/dl, $P < 0,001$) alors que la concentration moyenne de l'HbA_{1c} dans le groupe DMG (5,6%) indiquait un bon équilibre glycémique pour ce groupe. Le seul paramètre ne variant pas significativement entre les deux groupes était HDL-C ($P = 0,596$). Le génotypage a été réalisée avec des sondes fluorescentes (système TaqMan) ou avec le PCR-RFLP (mtDNA). Les variantes étudiées étaient dans l'équilibre de Hardy -Weinberg et n'étaient pas associées au diabète gestationnel dans la population du Sud du Brésil évalué. Une association entre l'IMC et le polymorphisme rs10885122 du gène *ADRA2A* a été trouvé dans le DMG, montrant que les porteurs de l'allèle T (GT+TT) présentaient une augmentation moyenne de 2,03 kg/m² par rapport à homozygotes GG. Les femmes enceintes du groupe contrôle et porteuses de l'allèle G de la variant rs1801282 du gène *PPARg* (génotypes CG+GG, Pro/Ala+Ala/Ala) présentaient une augmentation significative ($P = 0,003$) de l'IMC de 2,2 kg/m² en moyenne, par rapport aux homozygotes CC (Pro/Pro). Les femmes diabétiques porteuses de l'allèle G (génotypes CG+GG, Pro/Ala+Ala/Ala) avaient des concentrations sériques plus élevés de HDL-C par rapport à porteurs de l'allèle C (génotype CC, Pro/Pro). Les patientes présentant un diabète gestationnel et porteuses de l'allèle T (génotypes CT+TT) de la variant rs3758947 du gène *ABCC8* avaient une augmentation de la concentration sérique de 1,5 anhydroglucitol par rapport aux porteurs du génotype CC, suggérant un meilleur contrôle glycémique. Les concentrations sériques de produits de glycation avancée (AGEs), pentosidine et carboxyméthyllisine, quantifiés par LC-MS/MS, sont significativement plus élevés ($P < 0,05$) chez les femmes diabétiques par rapport aux sujets du groupe CTRL. L'indice athérogène de plasma (AIP) calculée par le rapport (TG/HDL-C) a permis l'identification des femmes à faible risque de développer un diabète gestationnel avant 24 semaines de grossesse. Les femmes enceintes avec AIP inférieure à 0,454, avant la 24^e semaine de grossesse, ont un risque moindre de diabète gestationnel. Ce paramètre peut donc être proposé pour le dépistage du DMG.

Mots-clés: diabète gestationnel, mtDNA, *ADRA2A*, *KCNQ1*, *PPARg*, *SLC2A2*, *ABCC8*, CML, MG-H1, pentosidine, Log(TG/HDL-C), SNP, les variations génétiques.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fluxograma para o diagnóstico do diabetes gestacional segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.	30
FIGURA 2	Novos critérios para o diagnóstico de diabetes gestacional.	31
FIGURA 3	Estratégia de dois passos proposta pelo Instituto Nacional da Saúde (NIH) para o diagnóstico do diabetes gestacional.	32
FIGURA 4	Principais complicações maternas e fetais associadas ao diabetes gestacional.	34
FIGURA 5	Relação entre o desenvolvimento fetal e os efeitos a longo prazo da glucose na expressão de genes no feto.	36
FIGURA 6	Variantes genéticas comuns entre o diabetes gestacional e o diabetes tipo 2.	40
FIGURA 7	Classificação do diabetes com base em fatores genéticos e epigenéticos que levam ao aparecimento da doença.	41
FIGURA 8	Função da mitocôndria na produção de ATP através da cadeia respiratória e localização do DNA mitocondrial.	43
FIGURA 9	Organização da mitocôndria.	44
FIGURA 10	Representação esquemática da estrutura do DNA mitocondrial (DNA dupla fita circular).	45
FIGURA 11	Homoplasmia e heteroplasmia no mtDNA.	46
FIGURA 12	Mecanismos envolvidos na disfunção da mitocôndria que desencadeiam doenças e o envelhecimento.	47
FIGURA 13	Mecanismo de regulação da liberação de insulina pelos receptores alfa-2 adrenérgicos.	50
FIGURA 14	Localização das principais variantes do gene <i>SLC2A2</i> .	56
FIGURA 15	Localização das principais variantes do gene <i>ABCC8</i> .	58
FIGURA 16	Mecanismo de ação dos genes na célula β pancreática e seu envolvimento na secreção de insulina estimulada pela glucose.	59
FIGURA 17	Mecanismo da reação de PCR em tempo real.	61
FIGURA 18	Exemplo de amplificação obtido na reação de PCR em tempo real.	63
FIGURA 19	Estágios da reação de glicação: Reação de Maillard.	66
FIGURA 20	Estrutura dos produtos derivados de modificações pós-traducionais.	68
FIGURA 21	AGEs derivados de resíduos de arginina.	73
FIGURA 22	Mecanismo de formação de íons na ionização por <i>electrospray</i> .	76
FIGURA 23	Diagrama esquemático de um detector de massas triplo quadrupolo.	77
FIGURA 24	Fluxograma de trabalho.	94
FIGURA 25	Índice aterogênico do plasma (AIP) em diferentes períodos da gestação nos grupos analisados.	107
FIGURA 26	Curvas ROC para os valores de AIP nos grupos controle e DMG nos períodos analisados.	108
FIGURA 27	Perfil de caracterização e quantificação da carboximetilisina (CML) por LC-MS/MS.	113

FIGURA 28	Perfil de caracterização e quantificação do metilglioxal derivado hidroimidazolona-1 (MG-H1) por LC-MS/MS.	114
FIGURA 29	Perfil de caracterização e quantificação da pentosidina por LC-MS/MS.	115
FIGURA 30	Perfil de caracterização e quantificação da lisina por LC-MS/MS.	116
FIGURA 31	Eletroforese de produto de PCR do fragmento contendo o polimorfismo A3243G do mtDNA.	120
FIGURA 32	Perfil eletroforético dos produtos de PCR-RFLP (293pb) do fragmento do DNA mitocondrial com a enzima <i>ApaI</i> .	120
FIGURA 33	Sequência de bases da região do polimorfismo A3243G amplificada (293pb) e o sítio de restrição da enzima <i>ApaI</i> .	121
FIGURA 34	Associação entre a Carboximetilisina/Lisina e os genótipos da variante rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i> nos grupos em estudo.	128
FIGURA 35	Associação entre o IMC e os genótipos da variante rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i> nos grupos em estudo.	129
FIGURA 36	Associação entre o IMC e os genótipos da variante rs1801282 do gene <i>PPARG</i> nos grupos em estudo.	138
FIGURA 37	Comparação entre o HDL-C e os genótipos da variante rs10885122 do gene <i>PPARG</i> nos grupos em estudo.	140
FIGURA 38	Associação entre o 1,5 Anidroglucitol e os genótipos da variante rs3758947 do gene <i>ABCC8</i> nos grupos em estudo.	149

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Dez países/territórios com maior número de casos de diabetes (20-79 anos de idade) em 2011 e 2030.	21
TABELA 2	Prevalência do <i>diabetes mellitus</i> gestacional entre diferentes populações.	26
TABELA 3	Hormônios associados às modificações na secreção e ação da insulina.	27
TABELA 4	Efeitos da gestação e da presença do DMG no metabolismo da glucose e insulina.	28
TABELA 5	Categorias de risco para o diabetes gestacional.	29
TABELA 6	Efeitos biológicos da ativação do <i>PPARγ</i> .	53
TABELA 7	Comparação entre os métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR).	62
TABELA 8	Genes em estudo com a técnica de PCR em tempo real (qPCR).	64
TABELA 9	Condições estabelecidas para a reação de PCR para amplificação da região do polimorfismo A3243G do mtDNA.	83
TABELA 10	Preparo do gel de poliacrilamida e condições utilizadas nos ensaios de PCR-RFLP para o polimorfismo A3243G do mtDNA.	84
TABELA 11	Protocolo para a detecção do polimorfismo A3243G do mtDNA por PCR-RFLP.	84
TABELA 12	Condições estabelecidas para a reação de PCR em tempo real.	85
TABELA 13	Identificação dos ensaios de PCR em tempo real empregados nas análises.	86
TABELA 14	Princípios metodológicos e reagentes para dosagem dos parâmetros bioquímicos.	88
TABELA 15	Protocolo de preparação das amostras para a hidrólise ácida.	89
TABELA 16	Caracterização da amostra em estudo.	95
TABELA 17	Concentrações séricas de parâmetros bioquímicos para os grupos em estudo.	99
TABELA 18	Parâmetros clínicos e laboratoriais dos subgrupos estudados.	105
TABELA 19	Concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos nos diferentes períodos gestacionais analisados no grupo controle.	106
TABELA 20	Concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos nos diferentes períodos gestacionais analisados no grupo DMG.	106
TABELA 21	Características antropométricas e laboratoriais do subgrupo empregado nas análises dos AGEs.	111
TABELA 22	Concentrações séricas dos produtos de glicação avançada (AGEs) nos grupos analisados.	117
TABELA 23	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo A3243G do mtDNA, na amostra em estudo.	122
TABELA 24	Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i> , na amostra em estudo.	124
TABELA 25	Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i> com dados da literatura.	125

TABELA 26	Variáveis com correlação linear (Pearson) significativa ($P < 0,05$) para o polimorfismo <i>ADRA2A</i> na amostra total e separados por grupos.	127
TABELA 27	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2237892 do gene <i>KCNQ1</i> , na amostra em estudo.	130
TABELA 28	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2237892 do gene <i>KCNQ1</i> com dados da literatura.	131
TABELA 29	Variáveis com correlação linear (Pearson) significativa ($P < 0,05$) para o polimorfismo <i>KCNQ1</i> na amostra total e separados por grupos.	133
TABELA 30	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1801282 do gene <i>PPARG</i> , na amostra em estudo.	134
TABELA 31	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs1801282 do gene <i>PPARG</i> com dados da literatura.	135
TABELA 32	Variáveis com correlação linear (Pearson) significativa ($P < 0,05$) para o polimorfismo <i>PPARG</i> na amostra total e separados por grupos.	138
TABELA 33	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs5393 do gene <i>SLC2A2</i> , na amostra em estudo.	142
TABELA 34	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs5393 do gene <i>SLC2A2</i> com dados da literatura.	143
TABELA 35	Variáveis com correlação linear (Pearson) significativa ($P < 0,05$) para o polimorfismo <i>SLC2A2</i> na amostra total e separados por grupos.	144
TABELA 36	Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3758947 do gene <i>ABCC8</i> , na amostra em estudo.	145
TABELA 37	Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3758947 do gene <i>ABCC8</i> com dados da literatura.	146
TABELA 38	Variáveis com correlação linear (Pearson) significativa ($P < 0,05$) para o polimorfismo <i>ABCC8</i> na amostra total e separados por grupos.	148

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Outros tipos específicos de diabetes.
ANEXO 2	Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.
ANEXO 3	Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).
ANEXO 4	Planilha de coleta de dados antropométricos, clínicos e laboratoriais.
ANEXO 5	Extração de DNA genômico
ANEXO 6	Detecção do polimorfismo rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i>
ANEXO 7	Detecção do polimorfismo rs2237892 do gene <i>KCNQ1</i>
ANEXO 8	Detecção do polimorfismo rs1801282 do gene <i>PPARG</i>
ANEXO 9	Detecção do polimorfismo rs5393 do gene <i>SLC2A2</i>
ANEXO 10	Detecção do polimorfismo rs3758947 do gene <i>ABCC8</i>
ANEXO 11	Artigo "The atherogenic index of plasma is a predictor of low risk of gestational diabetes in early pregnancy".
ANEXO 12	Exemplo para o cálculo da concentração de AGEs

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC8	- <i>ATP- binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8</i> Transportadores ABC, subfamília C, membro 8
ACD	- <i>Association canadienne du diabète</i> Associação Canadense de Diabetes
ADA	- <i>American Diabetes Association</i> Associação Americana de Diabetes
ADRA2A	- <i>Adrenergic alpha-2A receptor</i> Receptor alfa-2A adrenérgico
AGEs	- <i>Advanced glycation end products</i> Produtos de glicação avançada
Água ultra-pura	- Água obtida em sistema de ultra purificação Milli-Q (Millipore)
AV	- Amplitude de variação
CVa	- Coeficiente de variação analítico
DAC	- Doença Arterial Coronariana
DP	- Desvio padrão
HbA1C	- Hemoglobina glicada fração A1C
KCNQ1	- <i>Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1</i> Canal de potássio voltagem dependente, subfamília tipo KQT, membro 1
MODY	- <i>Maturity-onset diabetes of the Young</i> Diabetes da maturidade de início precoce
OMIM	- <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> Herança Mendeliana no homem online
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i> Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
PPAR γ	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> Receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
RAGE	- <i>Receptor for advanced glycation end-products</i> Receptor para produtos de glicação avançada (AGEs)
RS	- <i>Reference SNP</i> Identificação dos polimorfismos de um único nucleotídeo
SBD	- Sociedade Brasileira de Diabetes
SLC2A2	- <i>Solute carrier Family 2 (facilitated glucose transporter) member 2</i> Carreador de soluto família 2, transportador de glucose facilitada
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> Polimorfismo de único nucleotídeo
TOTG	- Teste oral de tolerância à glucose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Diabetes	21
3.2 Classificação	23
3.3 Sintomas	24
3.4 <i>Diabetes mellitus</i> gestacional	25
3.5 Perfil lipídico e o diabetes gestacional	38
3.6 Variações genéticas associadas ao diabetes gestacional	39
3.7 DNA mitocondrial (mtDNA)	43
3.8 Gene <i>ADRA2A</i>	49
3.9 Gene <i>KCNQ1</i>	51
3.10 Gene <i>PPARγ</i>	52
3.11 Gene <i>SLC2A2</i>	55
3.12 Gene <i>ABCC8</i>	56
3.13 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.	60
3.14 Produtos de glicação avançada (AGEs)	64
3.14.1 CML (carboximetilisina)	71
3.14.2 MG-H1 (metilglioxal derivado hidroimidazolona 1)	72
3.14.3 Pentosidina	73
3.15 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	74
4 MATERIAL E MÉTODOS	79
4.1 Detalhamento das atividades a serem desenvolvidas	79
4.2 Amostra	79
4.2.1 Critérios para a caracterização da amostra	80
4.3 Extração de DNA genômico	81
4.4 Quantificação do DNA	81
4.5 Reação de PCR para o polimorfismo A3243G do mtDNA	82
4.6 Detecção molecular do polimorfismo A3243G do mtDNA por PCR-RFLP	83
4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (TaqMan)	85
4.8 Quantificação das biomoléculas e dos parâmetros bioquímicos	86
4.9 Quantificação dos produtos de glicação avançada (AGEs) por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida	89
4.10 Análises estatísticas	92
4.11 Fluxograma de trabalho	94
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
5.1 Caracterização da amostra	95
5.1.1 Idade	96
5.1.2 Semanas de gestação	96
5.1.3 Etnia	97
5.1.4 Índice de massa corpórea (IMC)	97
5.1.5 Hipertensão arterial e tabagismo	98
5.1.6 Uso de insulina e complicações associadas ao diabetes gestacional	98

5.2 Análises bioquímicas	99
5.2.1 Marcadores de controle glicêmico	100
5.2.2 Proteína total e albumina	101
5.2.3 Ureia e creatinina	102
5.2.4 Ácido úrico	102
5.3 Perfil lipídico e análises do índice aterogênico do plasma (Log(TG/HDL-C))	103
5.4 Análise dos produtos de glicação avançada (AGEs)	110
5.5 Análises moleculares	120
5.5.1 Detecção do polimorfismo A3243G do mtDNA	120
5.5.2 Detecção do polimorfismo rs10885122 do gene <i>ADRA2A</i>	124
5.5.3 Detecção do polimorfismo rs2237892 do gene <i>KCNQ1</i>	130
5.5.4 Detecção do polimorfismo rs1801282 do gene <i>PPARγ</i>	134
5.5.5 Detecção do polimorfismo rs5393 do gene <i>SLC2A2</i>	141
5.5.6 Detecção do polimorfismo rs3758947 do gene <i>ABCC8</i>	145
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
7 CONCLUSÃO	152
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	154
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* é uma patologia que afeta grande número de indivíduos na população mundial, sendo estimado 11 milhões de casos para a população brasileira, no ano de 2025. Acredita-se que apenas 50% dos pacientes com diabetes tenham conhecimento e diagnóstico da patologia na população brasileira (SBD, 2004). No ano de 2011 foram estimados 366 milhões de casos de diabetes no mundo, o que corresponde a 8,3% da população adulta, sendo que 80% destes vivem em países em desenvolvimento. Para o ano de 2030, 552 milhões de pessoas terão diabetes, ou seja, 1 adulto em cada 10 e 3 novos casos a cada 10 segundos, ou seja, quase 10 milhões de novos casos por ano (IDF, 2013). Nos Estados Unidos, o diabetes é responsável pela morte de mais pessoas, a cada ano, do que outras doenças graves como a AIDS e o câncer de mama combinados (ADA,2013).

No ano de 2013, o diabetes acometeu 21 milhões de gestações no mundo. No Brasil, cerca de 7% das gestações são afetadas pelo diabetes gestacional, sendo fator predisponente para o aumento da morbidade na gestante, feto e neonato. É um dos problemas de saúde mais comuns que acometem as mulheres grávidas. A exposição intrauterina ao diabetes materno reduz a idade de início deste tipo de diabetes no neonato em aproximadamente 12 anos, bem como aumenta a predisposição para o desenvolvimento de obesidade durante a adolescência. O diabetes gestacional apresenta importante associação com componentes genéticos, porém pouco se sabe sobre a genética desta doença até o momento.

Diversos genes têm sido associados à patogênese do diabetes, em especial, ao diabetes tipo 2. O estudo de genes envolvidos na patogênese do diabetes tipo 2, em pacientes com diabetes gestacional é importante visto que os dois tipos de diabetes envolvem a resistência à insulina e compartilham outras características, inclusive genéticas.

O diabetes gestacional é um período interessante para estudos genéticos pois o estresse produzido pelo processo fisiológico da gestação favorece a manifestação de genótipos, fenótipos e alterações hormonais importantes.

Poucos estudos populacionais envolvendo variações genéticas e diabetes gestacional estão disponíveis para a população brasileira.

A análise de moléculas biomarcadoras como a glucose, hemoglobina glicada, 1,5-anidroglicitol, produtos de glicação avançada (AGEs), componentes do perfil

lipídico, entre outras, são importantes na busca de marcadores de risco e/ou proteção ao diabetes gestacional.

Determinar a frequência e o perfil polimórfico dos componentes genéticos em gestantes da população brasileira é relevante para o desenvolvimento de políticas públicas relacionadas ao diabetes, assim como para ampliar o conhecimento científico sobre esta patologia.

Neste trabalho propomos estudar variações genéticas de genes que estão associados ao diabetes ou às suas complicações como a obesidade, regulação glicêmica e processos inflamatórios, na busca de marcadores genéticos para o diabetes gestacional e/ou suas complicações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a associação entre a variabilidade genética do DNA mitocondrial e de outros genes associados ao diabetes; e a quantificação de biomoléculas marcadoras de risco e/ou proteção de processos patológicos, em gestantes saudáveis e com diabetes gestacional.

2.1.2 Objetivos específicos

- Estabelecer as condições experimentais para a reação em cadeia da polimerase (PCR) e caracterizar as frequências genotípicas e alélicas para o DNA mitocondrial, variante A3243G, através de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição); e associá-la com marcadores clínicos, laboratoriais e com a concentração de biomoléculas marcadoras de estresse oxidativo;
- Caracterizar as frequências genotípicas e alélicas das variantes rs10885122 do gene *ADRA2*, rs2237892 do gene *KCNQ1*, rs1801282 do gene *PPARG*, rs5393 do gene *SLC2A2*, rs3758947 do gene *ABCC8*, através de PCR em tempo real (qPCR); e associá-las com marcadores clínicos, laboratoriais e com a concentração de biomoléculas marcadoras de estresse oxidativo;
- Quantificar os produtos de glicação avançada (AGEs) pentosidina, N^ε-carboximetilisina (CML) e metilglioxal- derivado hidroimidazolona-1 (MG-H1) através da metodologia de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) na busca de biomarcadores para o diabetes gestacional;
- Identificar marcadores de risco e/ou proteção para o diabetes gestacional bem como avaliar biomarcadores de rotina para o seu diagnóstico.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Diabetes

O *Diabetes mellitus* é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina, ou em ambos (AMERICAN DIABETES, 2011; BASEVI *et al.*, 2011)

Os processos patológicos envolvidos no desenvolvimento do diabetes incluem a destruição autoimune das células β pancreáticas produzindo desde deficiência de insulina até anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina; e a ação deficiente de insulina nos tecidos alvos, provocando anormalidades no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas (AMERICAN DIABETES, 2013).

O diabetes é uma das doenças mais comuns não comunicáveis do mundo e é a quarta ou quinta causa de morte na maioria dos países em desenvolvimento. Na América Central e do Sul, 12,3% das mortes são decorrentes do diabetes (IDF, 2013).

Em 2011 foram estimados 366 milhões de casos de diabetes no mundo, o que corresponde a 8,3% da população adulta, sendo que 80% destes vivem em países em desenvolvimento. Estima-se que para o ano de 2030, 552 milhões de pessoas terão diabetes, ou seja, 1 adulto em cada 10 e 3 novos casos a cada 10 segundos, ou seja, quase 10 milhões de novos casos por ano (IDF, 2013). O diabetes é sem dúvidas, um dos problemas de saúde mais desafiadores do século 21. A tabela 1 apresenta os 10 países/territórios com maior número de casos de diabetes no mundo.

TABELA 1- DEZ PAÍSES/TERRITÓRIOS COM MAIOR NÚMERO DE CASOS DE DIABETES (20-79 ANOS DE IDADE) EM 2011 E 2030.

	País/Território	2011 (milhões)		País/Território	2030 (milhões)
1	China	90,0	1	China	129,7
2	Índia	61,3	2	Índia	101,2
3	Estados Unidos	23,7	3	Estados Unidos	29,6
4	Rússia	12,6	4	Brasil	19,6
5	Brasil	12,4	5	Bangladesh	16,8
6	Japão	10,7	6	México	16,4
7	México	10,3	7	Rússia	14,1
8	Bangladesh	8,4	8	Egito	12,4
9	Egito	7,3	9	Indonésia	11,8
10	Indonésia	7,3	10	Paquistão	11,4

Fonte: Adaptado de <http://www.idf.org/print/diabetesatlas/5e/the-global-burden>.

O diabetes acomete mais homens do que mulheres de maneira geral. Dados de 2011 mostram que 185 milhões de homens apresentam diabetes contra 181 milhões de mulheres. A expectativa é de que para o ano 2030 esta diferença diminua, passando a 277 milhões de homens vs 275 milhões de mulheres (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

A Federação Internacional de Diabetes estima que mundialmente 183 milhões de pessoas não saibam que tem diabetes. Em alguns países da África a proporção de pessoas com diabetes e que não tem diagnóstico pode chegar a 90% (EVARISTO-NETO; FOSS-FREITAS e FOSS, 2010). Mesmo em países desenvolvidos cerca de 1/3 da população não tem sido diagnosticada. Na América Central e do Sul este número chega a 44,7%. Para o Brasil, a Sociedade Brasileira de Diabetes estima que 50% das pessoas com diabetes não estão diagnosticadas. Quanto mais precocemente o diagnóstico for feito e o tratamento iniciado, melhores são as chances de prevenir os danos e as complicações bem como os custos relacionados à doença (SBD, 2004; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013)

Uma pessoa com diabetes pode viver anos sem apresentar qualquer sintoma, entretanto durante este período a alta concentração de glucose provoca danos no corpo de maneira silenciosa e as complicações podem se desenvolver como consequência da falta de tratamento. Estudos demonstram que muitas pessoas com diabetes não diagnosticado já apresentam complicações da doença como doença crônica renal, insuficiência cardíaca, retinopatia e neuropatia (SPIJKERMAN *et al.*, 2003; PLANTINGA *et al.*, 2010; FLORES-LE ROUX *et al.*, 2011).

As complicações decorrentes do diabetes são a maior causa de redução na qualidade de vida, morbidade e mortalidade, o que a torna um problema de saúde pública extremamente preocupante. Cerca de 50% dos diabéticos morrem de doença cardiovascular, 10-20% de insuficiência renal, a neuropatia afeta mais de 50% dos diabéticos e depois de 15 anos de doença, 2% das pessoas ficam cegas e 10% desenvolvem deficiência visual severa (WHO, 2009).

3.2 Classificação

A Associação Americana de Diabetes (AMERICAN DIABETES, 2011) propõe uma classificação baseada na etiologia das várias formas do diabetes amplamente aceita na comunidade científica. As quatro grandes categorias do diabetes são:

- I. *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1)
- II. *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2),
- III. Outras formas específicas de diabetes e
- IV. *Diabetes mellitus* gestacional (DMG).

O diabetes tipo 1 é resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição autoimune das células β pancreáticas. Essa condição é comumente designada como “diabetes juvenil” e no passado como diabetes “insulinodependente”. O diabetes tipo 1 pode ser do tipo imuno mediado onde há a presença de marcadores da destruição imune das células β (5-10% dos casos de diabetes são deste tipo) e do tipo idiopático, cuja etiologia não é conhecida (AMERICAN DIABETES, 2011).

O diabetes tipo 2 é causado pela combinação da resistência à insulina e a deficiência de produção deste hormônio, com o aumento da produção hepática de glucose. Muitos pacientes com esta forma de diabetes são obesos, e é sabido que a obesidade causa uma alteração na resistência à insulina. O DM2 era usualmente designado como “diabetes da maturidade” ou “diabetes não-insulino dependente”. As causas deste tipo de diabetes são múltiplas e ele é responsável por 90-95% dos casos de diabetes. Pacientes com DM2 apresentam risco aumentado de desenvolverem complicações macro e microvasculares. O risco de desenvolver este tipo de diabetes aumenta com a idade, obesidade e ausência de atividade física. O DM2 acomete mais mulheres que tiveram DMG e indivíduos com hipertensão arterial ou dislipidemia. Neste tipo de diabetes observa-se uma forte predisposição genética e o envolvimento de diversos genes na patogênese da doença (ALI, 2013). O DM2 se desenvolveu junto com as mudanças culturais e sociais, envelhecimento das populações, aumento da urbanização, mudanças na dieta, redução da atividade física e outros comportamentos não saudáveis (WHO, 1994).

A categoria de “outras formas de diabetes” inclui múltiplas e diferentes patologias associadas ao diabetes. São reconhecidos mais de 56 tipos específicos

de diabetes (AMERICAN DIABETES, 2013). Como principais grupos destacam-se: os defeitos genéticos que afetam a função das células β pancreáticas (diabetes tipo MODY, *maturity-onset diabetes of the young* ou diabetes da maturidade com início precoce); defeitos genéticos que afetam a ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediadas pelo sistema imune e síndromes genéticas associadas ao diabetes, em alguns casos (AMERICAN DIABETES, 2012, 2013). O anexo 1 detalha os tipos específicos de diabetes.

A definição clássica do *diabetes mellitus* gestacional (DMG) é qualquer grau de intolerância à glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (AMERICAN DIABETES, 2012). Acomete 1 a cada 25 gestações no mundo e é associado a complicações perinatais (IDF, 2013). Esta categoria será discutida em um tópico especial.

3.3 Sintomas

Os sintomas clássicos que caracterizam o diabetes incluem a hiperglicemia, ou seja, o aumento dos níveis de glucose no sangue acima de 126mg/dL em jejum (SBD, 2009), poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva persistente), polifagia (fome excessiva), perda de peso e visão embaçada (FOWLER, 2007).

A hiperglicemia crônica do diabetes leva, a longo prazo, à disfunção e falência de vários órgãos. As principais complicações associadas incluem: retinopatia com potencial perda de visão; nefropatia levando à insuficiência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés e amputações; neuropatia autonômica causando sintomas gastrointestinais, geniturinários e cardiovasculares bem como disfunção sexual. Pacientes com diabetes apresentam maior incidência de aterosclerose e doença cerebrovascular, além de hipertensão e alterações no metabolismo dos lipídeos (AMERICAN DIABETES, 2013).

3.4 *Diabetes mellitus* gestacional

A definição clássica do *diabetes mellitus* gestacional (DMG, diabetes gestacional) é a intolerância à glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez ou intolerância aos carboidratos com severidade variável a qual é diagnosticada na gestação e pode ou não persistir após o parto (BUCHANAN; XIANG, 2005; BUCHANAN *et al.*, 2007; AMERICAN DIABETES, 2011). De acordo com a Associação Americana de Diabetes 2014, o diabetes gestacional é definido como o diabetes diagnosticado durante a gestação e que claramente não é diabetes prévio ou manifesto (AMERICAN DIABETES, 2014b).

A severidade da doença é variável e a hiperglicemia materna, menos severa que os demais tipos de *diabetes mellitus*, está associada a um risco aumentado de complicações obstétricas e neonatal, morbidade e mortalidade (JOVANOVIC, 2001; METZGER *et al.*, 2008; NEGRATO *et al.*, 2010) sendo o DMG considerado uma das mais importantes complicações da gestação.

A frequência do DMG é de aproximadamente 7% nas gestações, variando de 1 a 14%, dependendo da população avaliada e dos critérios empregados para o diagnóstico (AMERICAN DIABETES, 2012). Outros fatores podem alterar a frequência da doença entre as populações, tais como fatores genéticos que afetam a resistência à insulina, dieta, estilo de vida, fatores socioculturais e o uso e acesso aos serviços de saúde. Os estudos apontam a detecção de mais de 200.000 casos anualmente nos Estados Unidos (AMERICAN DIABETES, 2012). A Tabela 2 apresenta a frequência do DMG em diferentes populações.

A incidência do DMG está aumentando juntamente com o aumento da incidência do DM2 e da prevalência da obesidade (KWAK; JANG e PARK, 2012). Isto porque o DMG e o DM2 compartilham os mesmos mecanismos patogênicos e parecem partilhar outras características, inclusive genéticas. A resistência à ação da insulina e a incapacidade das células β pancreáticas em secretar insulina, são mecanismos que constituem a patologia fisiologia de ambas as doenças (PRENTKI e NOLAN, 2006; BUCHANAN *et al.*, 2007). O DMG e o DM2 são essencialmente fases diferentes da mesma doença para as gestantes (ANNA *et al.*, 2008; ENGLAND *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010). Desta forma, a gestação pode ser considerada como uma condição de estresse para as células β pancreáticas.

TABELA 2- PREVALÊNCIA DO *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

País	Critério de diagnóstico	Prevalência
Nova Zelândia	Local	19,3%
Itália	Carpen-Coustan	13,3%
Estados Unidos	NDDG	13,0%
Canadá	NDDG	12,8%
Tailândia	NDDG	10,2%
Austrália	OMS	9,5%
Brasil	OMS	7,6%
Sri Lanka	OMS	5,5%
Irã	Carpen-Coustan	4,8%
Índia	OMS	3,8%
Etiópia	OMS	3,7%
Paquistão	Carpen-Coustan	3,5%
Dinamarca	OMS	3,2%
Japão	Local	2,9%
China	OMS	2,3%
Coréia	NDDG	2,2%
Reino Unido	EASD	1,2%
Suíça	EASD	1,2%
Turquia	NDDG	1,2%
Taiwan	OMS	0,6%

EASD: Associação Europeia para o estudo do diabetes,
 NDDG: Grupo Nacional de Dados sobre o Diabetes,
 OMS: Organização Mundial da Saúde.
 FONTE : Adaptado de Shaat; Groop (2007).

Como todas as formas de hiperglicemia, o DMG resulta de uma oferta inadequada de insulina endógena para a demanda tecidual (MEYER *et al.*, 1996), ou seja, as células β pancreáticas são incapazes de produzir insulina suficiente para compensar a resistência à insulina da gestação (BUCHANAN *et al.*, 2007).

A gestação normal é uma condição não patológica caracterizada por uma série de complexas alterações hormonais que ocorrem para garantir aporte suficiente de glucose para o crescimento fetal sem causar hipoglicemia materna (NEGRATO; MATTAR e GOMES, 2012).

A gravidez é acompanhada de progressiva resistência à insulina que inicia na metade da gestação e progride até o terceiro trimestre para níveis que se

aproximam aos observados em indivíduos com DM2 (BUCHANAN e XIANG, 2005). A gestação, portanto, é um estado hiperinsulinêmico caracterizado por uma diminuição da sensibilidade à insulina, parcialmente explicada pela elevação na concentração de hormônios diabetogênicos (bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina) produzidos pela placenta, tais como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário (DI CIANNI *et al.*, 2003). A Tabela 3 apresenta os hormônios associados às modificações na secreção e ação da insulina.

TABELA 3- HORMÔNIOS ASSOCIADOS ÀS MODIFICAÇÕES NA SECREÇÃO E AÇÃO DA INSULINA.

Hormônios	Efeitos
Estrógenos	↑ Concentração de insulina
	↑ Ligação de insulina
Progesterona	↓ Transporte de glucose
	↓ Ligação de insulina
	↓ Supressão da neoglucogênese hepática induzida pela insulina
Cortisol	↑ Resistência à insulina
	↓ Fosforilação do receptor de insulina
	↓ IRS-1
Hormônio lactogênio placentário	↓ Sensibilidade à insulina
	↑ Secreção de insulina
	↑ Síntese de insulina
	↑ Uso e oxidação da glucose
	↑ Metabolismo do cAMP
	↑ Número de células β
	↑ Massa de células β
Leptina	↑ Resistência à insulina (?)
Glucagon	↑ Resistência à insulina

IRS: substrato receptor de insulina-1.

FONTE: Adaptado de Di Cianni *et al*, 2003.

A resistência à insulina que se desenvolve no DMG é semelhante àquela presente no DM2, com a ação da insulina prejudicada devido à alterações na cascata de sinalização que envolvem o transporte de glucose e o metabolismo intracelular em tecidos sensíveis à insulina (DI CIANNI *et al.*, 2003). O grau de resistência à insulina pode ser influenciado pela obesidade e pela história familiar. Em mulheres obesas (IMC>30kg/m²), a incidência de DMG é de 1,4 a 20 vezes mais

alta do que em mulheres com peso normal (GALTIER-DEREURE; BOEGNER e BRINGER, 2000).

As concentrações da glicemia de jejum tendem a ser mais baixas na gestante, contudo, os valores pós-prandiais são mais elevados, principalmente naquelas em que não há um aumento adequado da liberação de insulina (MAGANHA *et al.*, 2003).

Existem duas formas de resistência à insulina em mulheres que desenvolvem diabetes gestacional. A primeira é identificada como a resistência fisiológica à insulina, normal da gestação; e a segunda é caracterizada como uma forma crônica, presente durante a gestação, e que se exacerba devido às mudanças fisiológicas provocadas pela gravidez (METZGER *et al.*, 2007).

Embora os mecanismos específicos da alteração da secreção e ação da insulina permaneçam incertos, uma contribuição substancial é feita por meio de modificações endócrinas que acompanham a gravidez. A Tabela 4 apresenta os efeitos da gestação e da presença do diabetes gestacional no metabolismo de glucose e insulina.

TABELA 4- EFEITOS DA GESTAÇÃO E DA PRESENÇA DO DMG NO METABOLISMO DA GLUCOSE E INSULINA.

Glucose (plasma)	↓ Jejum ↑ Pós prandial
Secreção de insulina	
Jejum	↑ Gestação normal ↑ DMG
Após sobrecarga: 1 hora	↑↑ Gestação normal ↑ DMG
2 horas	↑ Gestação normal ↑ DMG
Resistência à insulina	↑ Gestação normal ↑↑ DMG
Órgão alvo	Tecido muscular
Mecanismos moleculares	↓ Atividade tirosina quinase
	↑ PC1
	↑ IRS
	↑ TNF-α
	↑ GLUT 4

PC1: glicoproteína da diferenciação celular plasmática, expressa tanto na gestação normal quanto no DMG, e que pode modular a ação da insulina; IRS: substrato receptor de insulina; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; GLUT 4: transportador de glucose tipo 4.

FONTE: Adaptado de Di Cianni *et al.*, 2003.

Vários fatores de risco associados ao DMG estão estabelecidos. A Tabela 5 apresenta as categorias de risco do diabetes gestacional.

TABELA 5- CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL.

Categoria do risco	Características clínicas
Risco Alto (A presença de qualquer um dos fatores é suficiente para o enquadramento nesta categoria)	<ul style="list-style-type: none"> • Obesidade marcante • Diabetes em parentes consanguíneos de primeiro grau • História pessoal de intolerância à glucose • Gestação anterior com neonato macrossômico • Presença de glicosúria
Risco Médio	<ul style="list-style-type: none"> • Não se enquadra como risco alto ou baixo
Risco Baixo (É necessário apresentar todas as características)	<ul style="list-style-type: none"> • Idade < 25 anos • Etnia associada a baixo risco • Ausência de diabetes em parentes consanguíneos de primeiro grau • Ganho normal de peso antes e durante a gravidez • Ausência de história de concentrações de glucose séricas anormais • Ausência de intercorrências obstétricas prévias

FONTE: Adaptado de Buchanan; Xiang (2005) com modificações.

Diversos protocolos para o diagnóstico do DMG estão em uso internacionalmente e não existe ainda um consenso mundial. A falta de uniformidade nos critérios diagnósticos e no controle da doença perpetuaram práticas divergentes.

Alguns estudos demonstram que a detecção precoce e o tratamento adequado do diabetes gestacional trazem benefícios para a mãe e o feto e diminuem as chances de complicações associadas à doença (CROWTHER *et al.*, 2005; LANDON *et al.*, 2009; SACKS, 2009).

A Figura 1 apresenta o procedimento para o diagnóstico do diabetes gestacional empregado no Brasil até o ano de 2011. Valores de glicemia de jejum inferiores a 85mg/dL, associados à presença de fatores de risco para diabetes gestacional indicam a necessidade de repetição da glicemia de jejum a partir da 24ª semana.

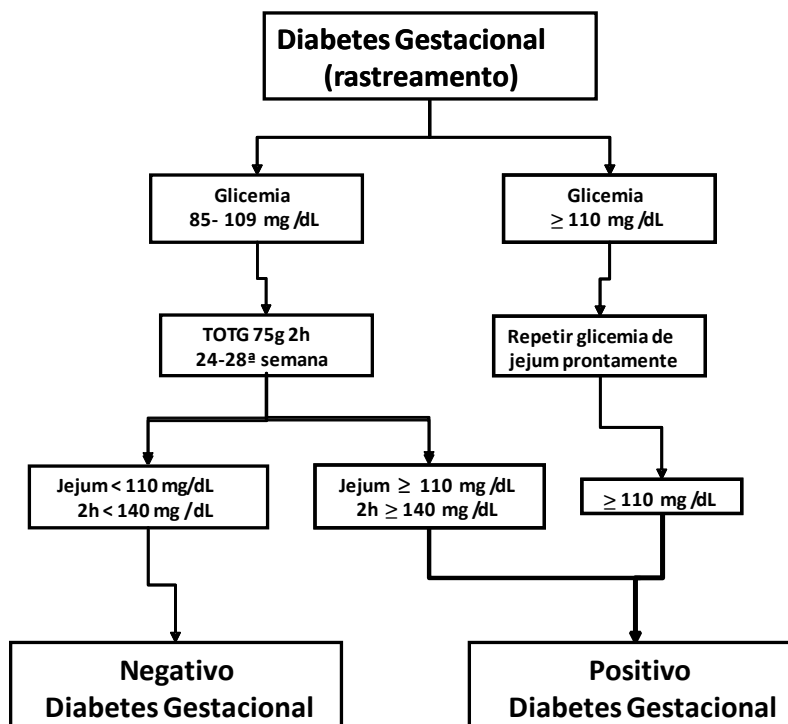


FIGURA 1- FLUXOGRAMA PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES GESTACIONAL SEGUNDO AS RECOMENDAÇÕES DO MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL.

TOTG: Teste oral de tolerância à glucose.

FONTE: Retirado das informações do Ministério da Saúde do Brasil, 2001 e SBD, 2009.

Segundo a Associação Americana de Diabetes (AMERICAN DIABETES, 2011), os critérios empregados para o diagnóstico do diabetes gestacional até o ano de 2010 facilitavam uma estratégia uniforme para a sua detecção e classificação. Entretanto, a continuidade das pesquisas demonstrou limitações nestes procedimentos. Na busca de consenso, nos anos de 2008-2009, o IADPSG, um grupo de consenso internacional com representantes de múltiplas organizações obstétricas e de diabetes, incluindo a ADA, desenvolveu recomendações revisadas para o diagnóstico do diabetes gestacional. O grupo recomenda que todas as mulheres que não tenham diabetes sejam submetidas ao teste oral de tolerância à glucose com 75g (TOTG 75g) entre a 24ª e a 28ª semanas de gestação. Além disso, o grupo determinou valores de corte para as medidas de glicemia de jejum, uma hora e duas horas pós-prandial. A figura 2 apresenta os novos critérios para o diagnóstico do diabetes gestacional de acordo com a ADA, 2011.

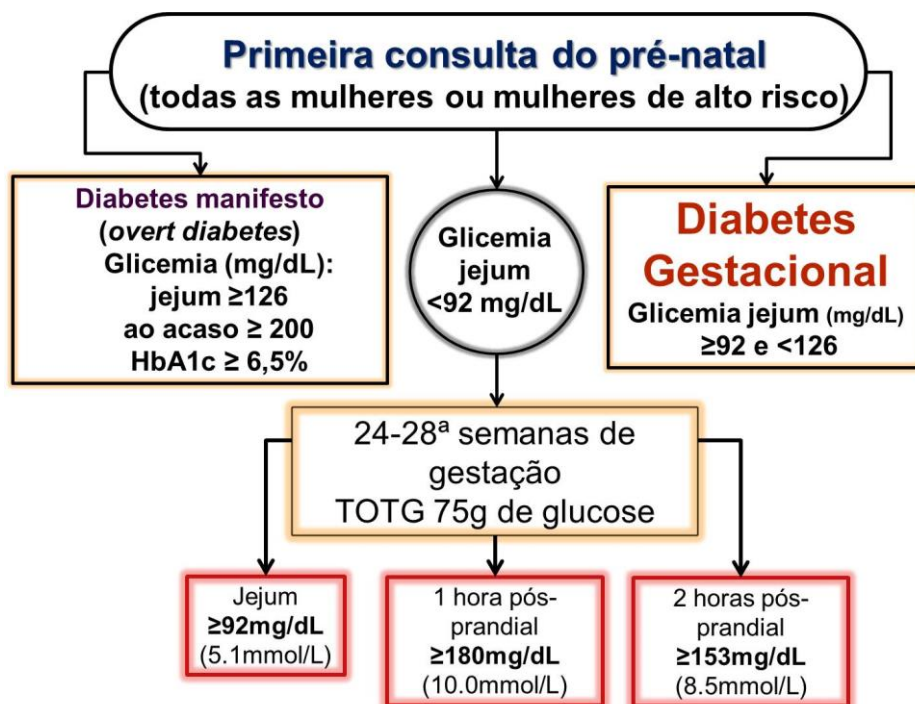


FIGURA 2- NOVOS CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DE DIABETES GESTACIONAL.

Para que o diagnóstico seja feito, é necessário que pelo menos uma das medidas de glicemia esteja igual ou acima dos valores de corte supracitados.

TOTG: teste oral de tolerância à glucose.

FONTE: (AMERICAN DIABETES, 2011; AMERICAN DIABETES, 2014).

Em conformidade com os novos critérios de corte para o diagnóstico, as recentes mudanças sugeridas devem aumentar de maneira significativa a prevalência do diabetes gestacional. Estima-se que este tipo de diabetes possa afetar 18% das gestações (METZGER *et al.*, 2010). Isto porque somente uma medida alterada no teste oral de tolerância à glucose será suficiente para que o diagnóstico seja estabelecido. Além disso, os novos critérios buscam evitar que as mulheres que apresentem diabetes prévio à gestação sejam caracterizadas com diabetes gestacional (AMERICAN DIABETES, 2011).

Nas diretrizes da ADA, atualizadas para o ano de 2014, novas e substanciais abordagens foram estabelecidas para o diagnóstico do DMG. Esta sociedade internacional passou a aceitar duas estratégias de detecção para o diagnóstico do diabetes gestacional. A primeira delas já citada acima, denominada de “um passo” e a segunda denominada de “dois passos” (AMERICAN DIABETES, 2014). A estratégia de dois passos foi proposta pelo Instituto Nacional da Saúde Norte

Americano (NIH) e recomenda a triagem com teste de carga de glucose com 50g e a dosagem da glicemia após 1 hora entre as 24^a e 28^a semanas de gestação, seguido por um teste oral de tolerância à glucose com 100g e a dosagem de glicemia após 3 horas para àquelas com resultado positivo para o primeiro teste. Esta estratégia é amplamente empregada nos Estados Unidos. A figura 3 apresenta a segunda estratégia aceita para o diagnóstico do DMG, proposta pelo NIH.

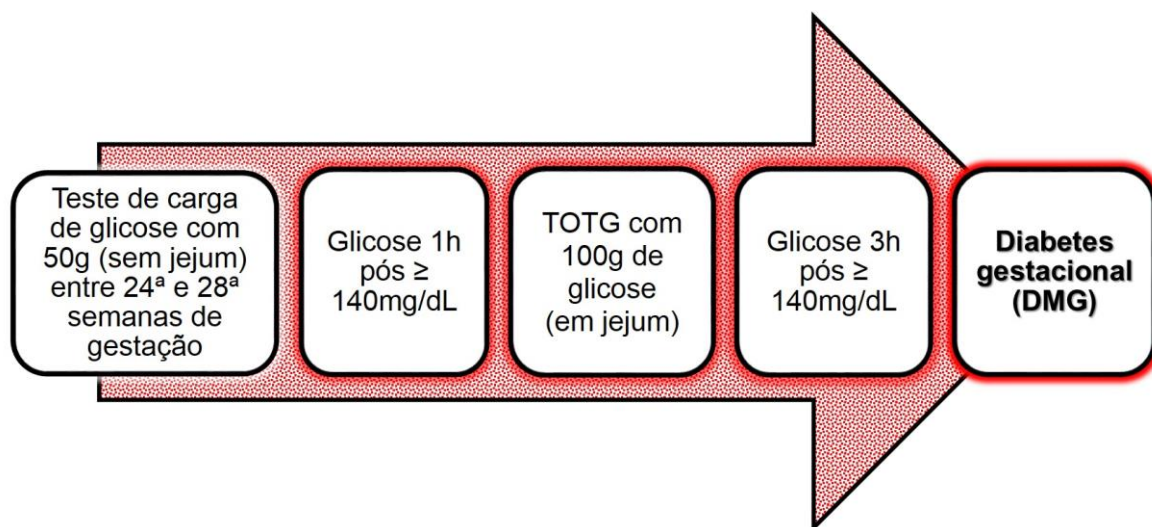


FIGURA 3- ESTRATÉGIA DE DOIS PASSOS PROPOSTA PELO INSTITUTO NACIONAL DA SAÚDE (NIH) PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES GESTACIONAL.

O diagnóstico do DMG só é confirmado quando os dois testes utilizados apresentam glucose pós sobrecarga $\geq 140\text{mg/dL}$.

TOTG: Teste oral de tolerância à glucose.

FONTE: (AMERICAN DIABETES, 2014).

As recomendações para a detecção e diagnóstico do diabetes gestacional incluem:

- Mulheres que apresentam fatores de risco: a triagem para diabetes tipo 2 não diagnosticado deve ser feita na primeira consulta de pré-natal, usando os critérios diagnósticos padrão para este tipo de diabetes;
- Gestantes que não tenham diabetes: a triagem deve ser feita com o teste oral de tolerância a glucose com 75 g entre a 24^a e a 28^a semanas de gestação utilizando os pontos de corte da figura 2;

- Mulher com DMG: deve ser realizada triagem para a persistência do diabetes após o parto. Recomenda-se que seja feita entre 6 e 12 semanas após o parto;
- Mulheres com DMG devem ser rastreadas ao longo da vida para o desenvolvimento de diabetes ou pré-diabetes, pelo menos a cada três anos (AMERICAN DIABETES, 2011, 2012).

As recomendações conflitantes para o diagnóstico do diabetes gestacional são consequência da ausência de análises de custo-benefício que avaliem os benefícios obtidos pela mudança nos critérios contra o aumento dos custos gerados. Não existem dados suficientes para demonstrar a superioridade de uma estratégia sobre a outra e há a necessidade de mais estudos na área para que se possa chegar a um consenso (AMERICAN DIABETES, 2014).

Concentrações elevadas de glucose durante a gestação provocam efeitos adversos no feto ao longo do período gestacional. O DMG tem impacto importante para o feto e o neonato (METZGER *et al.*, 2007). Na concepção e no início da gestação (primeiro trimestre), a hiperglicemia aumenta os riscos de malformações fetais. Mais tarde na gravidez, aumenta o risco de macrosomia e complicações metabólicas no parto (PERSSON; NORMAN e HANSON, 2009). A figura 4 apresenta as principais complicações maternas e fetais associadas ao DMG.

Na presença do DMG o risco de complicações como a macrosomia, feto com mais de 4 kg (ZHANG *et al.*, 2008), e de outras morbidades fetais, tais como: hipoglicemia, hipocalcemia, toco-traumatismos, policitemia, distúrbios respiratórios, malformações congênitas, hipertrofia cardíaca, hipomagnesemia, crescimento intrauterino retardado e icterícia prolongada; é expressivamente aumentada (FUKS, 2008).



FIGURA 4- PRINCIPAIS COMPLICAÇÕES MATERNAS E FETAIS ASSOCIADAS AO DIABETES GESTACIONAL.

FONTE: Adaptado do *Manual de la asociación Colombiana de Endocrinología*, Williams Ginecología; (FUKS, 2008).

A macrossomia, importante complicação fetal, ocorre quando grandes quantidades de glucose materna passam para o feto (através da placenta e por difusão facilitada), o que produz uma hiperglicemia com consequente hiperinsulinemia fetal que pode levar à macrossomia (Hipótese de Pedersen, 1952)

(PEDERSEN, 1952). A exposição dos tecidos do feto a qualquer grau de hiperglicemia estimula a secreção de insulina que pode causar hipertrofia dos tecidos sensíveis à insulina como o tecido adiposo, o músculo esquelético e o miocárdio, e até mesmo as ilhotas de Langerhans no pâncreas. Como resultado, pode ser encontrado um crescimento fetal acelerado e eventualmente a macrossomia. O diabetes é responsável por 30% dos casos de macrossomia. Complicações decorrentes da macrossomia incluem distócia de ombro, injúrias do plexo braquial, fraturas na clavícula e cesárea (GILMARTIN; URAL e REPKE, 2008).

Após o parto e à secção do cordão umbilical, a privação do aporte materno de glucose pode levar o feto à hipoglicemia (glucose entre 36-50mg/dL) nas primeiras horas de vida, à hipocalcemia (cálcio <7 mg/dL) e à hipomagnesemia (magnésio < 1,5mg/dL).

Como complicações tardias, crianças nascidas de mães diabéticas possuem maior chance de apresentarem obesidade, intolerância à glucose ou diabetes na adolescência, hipertensão e doença cardiovascular (KIM; NEWTON e KNOPP, 2002; SIMMONS, 2005). A história materna de DMG aumenta os fatores de risco para doenças cardiometabólicas durante a infância (TAM *et al.*, 2008).

Os efeitos causados no feto dependem do tempo, duração e nível de exposição à hiperglicemia. A exposição intrauterina à hiperglicemia aumenta de 4 a 8 vezes o risco fetal (KHAN *et al.*, 2006; METZGER *et al.*, 2008). Gestações diabéticas induzem anormalidades na homeostase de glucose e na secreção de insulina no feto, o que resulta em crescimento fetal anormal (PETTITT *et al.*, 1983).

Em crianças nascidas de mães com DMG não diagnosticado ou descontrolado ocorre, no útero, durante o desenvolvimento dos órgãos e crescimento fetal, uma alteração permanente na sua estrutura ou função fisiológica, o que é chamado de programação fetal. A exposição precoce à níveis elevados de insulina pode levar a uma má programação de funções críticas relacionadas ao desenvolvimento de diabetes e de obesidade mais tarde na vida (PLAGEMANN, 2005).

A exposição à um meio intrauterino adverso com hiperglicemia e hiperinsulinemia, pode alterar a expressão do genoma fetal levando a efeitos permanentes em uma variedade de processos fisiológicos, responsáveis pela programação do desenvolvimento (PINNEY e SIMMONS, 2011). A figura 5

apresenta a relação entre o desenvolvimento fetal e os efeitos a longo prazo na expressão de genes no feto.

Um crescimento intrauterino restrito aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronária, hipertensão e diabetes não dependente de insulina durante a vida adulta (ORNOY, 2011; VEERASWAMY *et al.*, 2012). O determinante dominante de crescimento fetal é o meio nutricional e hormonal no qual o feto se desenvolve.



FIGURA 5- RELAÇÃO ENTRE O DESENVOLVIMENTO FETAL E OS EFEITOS A LONGO PRAZO DA GLUCOSE NA EXPRESSÃO DE GENES NO FETO.

FONTE: Adaptado de VEERASWAMY *et al.*, 2012.

As complicações decorrentes do DMG para a mãe estão entre as principais causas de mortalidade materna e são representados pela hemorragia, desordem hipertensiva, trabalho de parto obstruído e infecções/sepses (KHAN *et al.*, 2006).

Quando descoberto o diabetes gestacional, deve-se iniciar o tratamento imediatamente. O objetivo do tratamento é manter os níveis de glucose iguais aos

de mulheres grávidas sem diabetes. O tratamento inclui primariamente planejamento alimentar com redução calórica balanceada e atividade física, podendo haver necessidade de injeções de insulina (SBD, 2009).

O Colégio Americano de Obstétricas e Ginecologistas (ACOG) recomenda introduzir a insulina, como tratamento do DMG quando a glicemia de jejum estiver superior a 105 mg/dL em pacientes com adesão à dieta e/ou quando a glicemia pós-prandial (duas horas após a refeição) for superior a 120 mg/dL.

A Associação Americana de Diabetes recomenda as seguintes metas de controle glicêmico durante a gestação:

- Antes das refeições (pré-prandial) 95mg/dl ou menos
- 1 hora pós-refeição (pós-prandial) 140mg/dl ou menos
- 2 horas pós-refeição (pós-prandial) 120mg/dl ou menos

O uso de hipoglicemiantes orais para o tratamento do DMG é bastante discutido na literatura e diversos grupos estudam os efeitos destes medicamentos na gestação e no neonato (PETRY, 2010; NIROMANESH *et al.*, 2012). Não são conhecidos os efeitos que estes medicamentos podem ter a longo prazo. Sabe-se que a metformina é capaz de atravessar a placenta (KOVO *et al.*, 2008), já a gliburida parece não apresentar esta propriedade (ELLIOTT *et al.*, 1991). Devido a estes fatores é que a insulina é o medicamento de primeira escolha para o tratamento do DMG, uma vez que não atravessa a placenta, apresenta flexibilidade nas doses e não foi associada ao aumento na incidência de eventos adversos na gestação (PETRY, 2010).

Mulheres com diabetes gestacional são mais propensas a desenvolver diabetes tipo 2, hipertensão e doença cardiovascular do que aquelas que mantiveram os níveis normais de glicemia durante a gestação (ENGLAND *et al.*, 2009). Diversos fatores contribuem para a evolução para o DM2 em gestantes com DMG prévio: DMG diagnosticado antes das 24 semanas de gestação (risco em 5 anos de 80%); glicemia de jejum alta antes da gestação; defeito na secreção de insulina aparente; terapia com uso de insulina na gestação; obesidade antes da gestação (risco de 50-75%); história familiar de *diabetes mellitus*; ganho de peso excessivo pós parto; mulheres não caucasianas (BUCHANAN *et al.*, 1998).

A gestação é um período muito oportuno para prover serviços de atenção materna, não somente para reduzir a morbidade e mortalidade, mas também para a

prevenção de várias doenças como o diabetes tipo 2, HAS (hipertensão arterial sistêmica) e DAC (doença arterial coronariana), visto que é um período em que ocorrem alterações hormonais, hemodinâmicas, metabólicas e imunológicas importantes (NEGRATO; MATTAR e GOMES, 2012; VEERASWAMY *et al.*, 2012).

3.5 Perfil lipídico e o diabetes gestacional

A gestação é caracterizada por uma complexa adaptação metabólica-endócrina que inclui alteração na sensibilidade à insulina; resposta aumentada das células β pancreáticas; aumento moderado na glicemia, especialmente após as refeições; e alterações na concentração de ácidos graxos, triglicérides, colesterol e fosfolípidos (DI CIANNI *et al.*, 2003). Estas alterações são adaptações necessárias para preparar o organismo materno para o parto e para a amamentação, e para atender às demandas energéticas do feto relacionadas ao seu metabolismo e crescimento (DI CIANNI *et al.*, 2005).

O metabolismo de lipídeos é essencial para o desenvolvimento de uma gestação saudável (DI CIANNI *et al.*, 2003). O colesterol é usado pela placenta para a síntese de esteroides e ácidos biliares (BUTTE, 2000) e para a proliferação celular (SUAREZ *et al.*, 2002); e os ácidos graxos, aumentados durante a gestação, contribuem para a condição de resistência à insulina bem como para o desenvolvimento de macrosomia fetal, uma vez que passam livremente pela placenta (KNOPP *et al.*, 1992).

O perfil lipídico se altera na gestação e, durante a sua segunda metade, é possível encontrar um perfil lipídico que mimetiza os achados patológicos da síndrome metabólica (MARTIN *et al.*, 1999; WIZNITZER *et al.*, 2009). A mudança no status hormonal é responsável pelo aumento no perfil lipídico durante a gestação (KNOPP *et al.*, 1982). A presença do *diabetes mellitus* materno acentua as mudanças metabólicas que ocorrem na gestação (BUTTE, 2000) e pode levar a uma composição alterada de lipoproteínas séricas fetais, consistente com alto risco aterogênico (ORDOVAS; POCOVI e GRANDE, 1984; MERZOUK *et al.*, 2000).

Fatores genéticos, como os polimorfismos no gene ApoE, podem influenciar potencialmente o metabolismo lipídico na gestação saudável (MCGLADDERY e FROHLICH, 2001). A associação entre concentrações séricas maternas de

triglicérides e o peso do recém nato foi descrita, indicando aumento de peso no recém nato associado à maiores concentrações de triglicérides materno (NOLAN *et al.*, 1995).

Na presença de DMG, há um aumento de 3 vezes na concentração dos triglicérides durante o terceiro trimestre de gestação e elevação dos ácidos graxos quando comparado a gestações saudáveis (METZGER *et al.*, 1980). A dislipidemia, induzida pelo DMG, é consistente com a resistência à ação da insulina (KOUKKOU; WATTS e LOWY, 1996).

O índice aterogênico do plasma (AIP) corresponde ao logaritmo da razão entre triglicérides e HDL-C. Este índice é um marcador de aterogenicidade no plasma (TAN; JOHNS e GLAZER, 2004) descrito por Dobiasová e Frohlich (DOBIASOVA e FROHLICH, 2001). Como descrito na literatura, durante a gestação altas concentrações de triglicérides são encontradas e estão associadas ao DMG (MCGROWDER *et al.*, 2009), ao pré diabetes e ao diabetes assintomático em adultos (AMERICAN DIABETES, 2009). O uso deste índice permite a identificação destas alterações lipídicas com alta sensibilidade, uma vez que o aumento nos triglicérides está frequentemente associado a uma redução no HDL-C.

Nosso objetivo ao avaliar este índice na população de gestantes saudáveis e com DMG, foi verificar se este pode ser um marcador para o diabetes na gestação, uma vez que apresenta alta sensibilidade na identificação de alterações no padrão do perfil lipídico e baixo custo operacional.

3.6 Variações genéticas associadas ao diabetes gestacional

Os estudos genéticos em grandes grupos populacionais e o desenvolvimento e melhoramento das tecnologias empregadas nas análises genéticas têm proporcionado maior conhecimento a respeito da genética dos tipos de diabetes (PETRY, 2010). Estes estudos permitiram a detecção de marcadores genéticos de risco nos genes ou próximo a eles (variantes em desequilíbrio de ligação).

Como mulheres com DMG apresentam alto risco para o desenvolvimento de DM2 pós-parto e como ambos os tipos de diabetes compartilham características fisiológicas, diversos estudos surgiram a fim de investigar se estes tipos de diabetes

partilham também fatores genéticos (Figura 6) (CHO *et al.*, 2009; LAUENBORG *et al.*, 2009; KWAK; JANG e PARK, 2012).

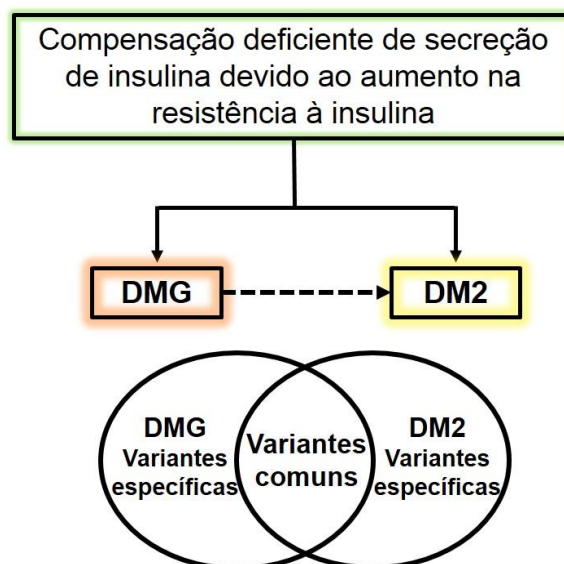


FIGURA 6- VARIANTES GENÉTICAS COMUNS ENTRE O DIABETES GESTACIONAL E O DIABETES TIPO 2.
FONTE: Adaptado de (KWAK; JANG e PARK, 2012).

Em um passado recente, poucos marcadores genéticos, à exceção dos genes *PPAR γ* e *KCNJ11*, estavam associados fortemente ao diabetes tipo 2 (FRAYLING, 2007). A lista atualizada conta com mais de 22 *loci* (WEEDON *et al.*, 2006; DORIA; PATTI e KAHN, 2008; PASCOE *et al.*, 2008; UNOKI *et al.*, 2008; YASUDA *et al.*, 2008). Posteriormente a estes trabalhos, pelo menos 10 desses *loci* foram associados com o risco para DMG (*KCNJ11*, *TCF7L2*, *KCNQ1*, *FTO*, *SLC30A8*, *TCF2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/CDKN2B*, *HHEX/IDE*, *IGF2BP2*) (SHAAT *et al.*, 2005; SHAAT e GROOP, 2007; WATANABE *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2009; LAUENBORG *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2010). Outros marcadores associados menos fortemente ao DM2 em algumas populações, também foram associados ao risco de DMG. Entretanto, os achados para o DMG são frequentemente baseados em amostras populacionais relativamente pequenas, não permitindo assim a confirmação dos achados em outras populações (PETRY, 2010). No entanto, marcadores polimórficos nos seguintes genes, podem contribuir para o risco poligênico do DMG: receptor de insulina substrato 1 (FALLUCCA *et al.*, 2006); receptor $\beta 3$ adrenérgico (FESTA *et al.*, 1999); lectina ligadora de manose (MEGIA *et al.*, 2004); calpaína (LEIPOLD *et al.*, 2004); receptor da insulina (OBER *et al.*, 1989);

receptor da sulfonilureia 1 (RISSANEN *et al.*, 2000); tRNA Leu mitocondrial (CHEN *et al.*, 2000); glucoquinase (SHAAT *et al.*, 2006); fator nuclear hepatocitário 1- α (SHAAT *et al.*, 2006).

Estudos de segregação familiar mostram um aumento da prevalência de diabetes tipo 1 em filhos de mães com DMG (DORNER; PLAGEMANN e REINAGEL, 1987). Isto sugere que o DMG também pode ser causado pela variação genética que predispõe uma mulher ao diabetes tipo 1 autoimune ou diabetes autoimune tardio na vida adulta. 10% das mulheres com DMG podem ter uma forma autoimune desta doença (LAPOLLA; DALFRA e FEDELE, 2009).

Da mesma forma que para o diabetes tipos 1 e 2, o risco global genético para o DMG parece ser formado a partir da contribuição relativamente pequena de vários genes (LAUENBORG *et al.*, 2009).

As formas monogênicas de diabetes como o tipo MODY (*Maturity-onset diabetes of the Young*; diabetes da maturidade de início precoce) e o diabetes mitocondrial (de herança materna), contribuem em cerca de 5% dos casos, para o diabetes gestacional. Os genes envolvidos nesses subtipos de diabetes e de diabetes gestacional parecem ter importante efeito na função das células β pancreáticas e os pacientes frequentemente não têm evidência de resistência à insulina crônica (METZGER *et al.*, 2007). A figura 7 mostra a classificação do diabetes com ênfase nos fatores genéticos e epigenéticos associados ao processo patológico.

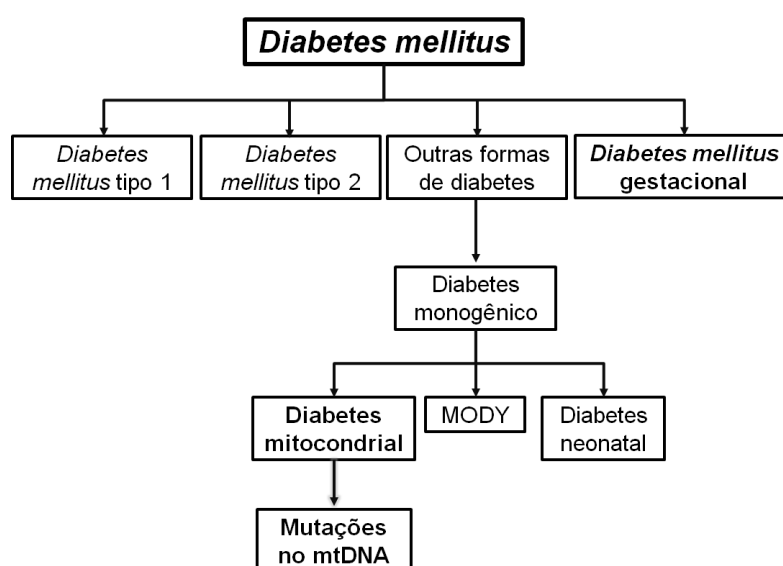


FIGURA 7- CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES COM BASE EM FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS.
FONTE: Adaptado de (SCHIFF *et al.*, 2009).

Constituindo o grupo “outras formas de diabetes” estão elencados os tipos de diabetes decorrentes de defeitos genéticos na função das células β . Este grupo inclui o diabetes tipo MODY, o diabetes mitocondrial, entre outros (AMERICAN DIABETES, 2011).

O diabetes gestacional apresenta forte hereditariedade. Mulheres com diabetes gestacional frequentemente possuem história materna de diabetes, o que sugere um componente genético para a doença (MARTIN *et al.*, 1985). Quando comparado com mulheres grávidas com tolerância normal à glucose, as mulheres com DMG apresentam forte história familiar de DM2 (13,2% vs 30,1%, $p < 0,001$) (JANG *et al.*, 1998).

Uma vez que a transmissão mitocondrial é exclusivamente materna (padrão de herança aceito) e tanto a disfunção das células β quanto a diminuição da sensibilidade a insulina foram encontradas associadas com mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), este pode ser um gene candidato para o DMG (POULTON *et al.*, 1995). Os genes mitocondriais podem mediar alterações no crescimento fetal através da alteração da disponibilidade e transferência de nutrientes para o feto (PETRY, 2010).

Associações entre *diabetes mellitus* gestacional e variantes no mtDNA têm sido descritas. Yanagisawa *et al.* (1995) e Chen *et al.* (2000), sugeriram que mutações no mtDNA podem contribuir para o desenvolvimento de diabetes gestacional em algumas pacientes. Entretanto, outros estudos não encontraram associação entre variações no mtDNA e o diabetes gestacional (ALLAN *et al.*, 1997; ALEVIZAKI *et al.*, 2000). Essa diversidade nos resultados pode ser, em parte, devido à heterogeneidade étnica das populações (SHAAT *et al.*, 2004). Os estudos disponíveis na literatura associando variações no mtDNA a patologias, têm focado em variações pontuais (SNPs).

O progresso no estudo da genética do DMG é imprescindível para uma melhor compreensão da patologia. Até o momento sabe-se que o risco genético para o seu desenvolvimento é poligênico (LAUENBORG *et al.*, 2009) e que genes associados aos diabetes tipos 1 e 2 tendem a estar associados ao DMG.

3.7 DNA mitocondrial (mtDNA)

As mitocôndrias são encontradas no citoplasma de todas as células nucleadas de eucariotos (GREAVES e TURNBULL, 2009). Possuem uma variedade de funções incluindo metabolismo intermediário (ciclo do ácido cítrico e β oxidação dos ácidos graxos), ciclo da ureia, armazenamento de cálcio e síntese de heme. Entretanto, a função mais importante é a obtenção de ATP por fosforilação oxidativa, através do transporte de elétrons na cadeia respiratória (complexos I-IV) e da ATP sintase (complexo V). A atividade da mitocôndria é essencial para a adequada secreção de insulina induzida pela glucose (MAASSEN *et al.*, 2004). A figura 8 apresenta o mecanismo envolvido na produção do ATP na mitocôndria.

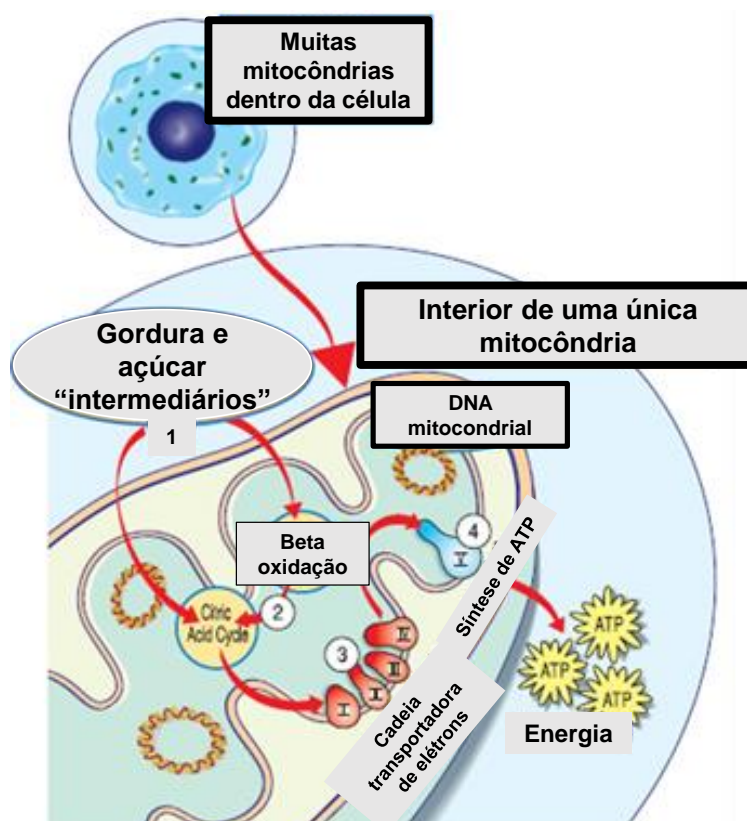


FIGURA 8- FUNÇÃO DA MITOCÔNDRIA NA PRODUÇÃO DE ATP ATRAVÉS DA CADEIA RESPIRATÓRIA E LOCALIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL.

(1) A mitocôndria utiliza a gordura e os açúcares intermediários para o (2) ciclo do ácido cítrico e para a beta oxidação. (3) A cadeia transportadora de elétrons produz ATP através da incorporação e transferência de elétrons (4). O ATP fornece a energia necessária para diversas reações bioquímicas.

FONTE: Adaptado de Ward Dean. Mitochondrial Restoration, Part I Dysfunction, Nutrition and Aging, 2000.

As mitocôndrias apresentam estrutura cilíndrica com aproximadamente 0,5-1 μ de diâmetro. São organizadas em matriz, crista mitocondrial, membrana interna, membrana externa e espaço intramembranar, como apresentado na figura 9.

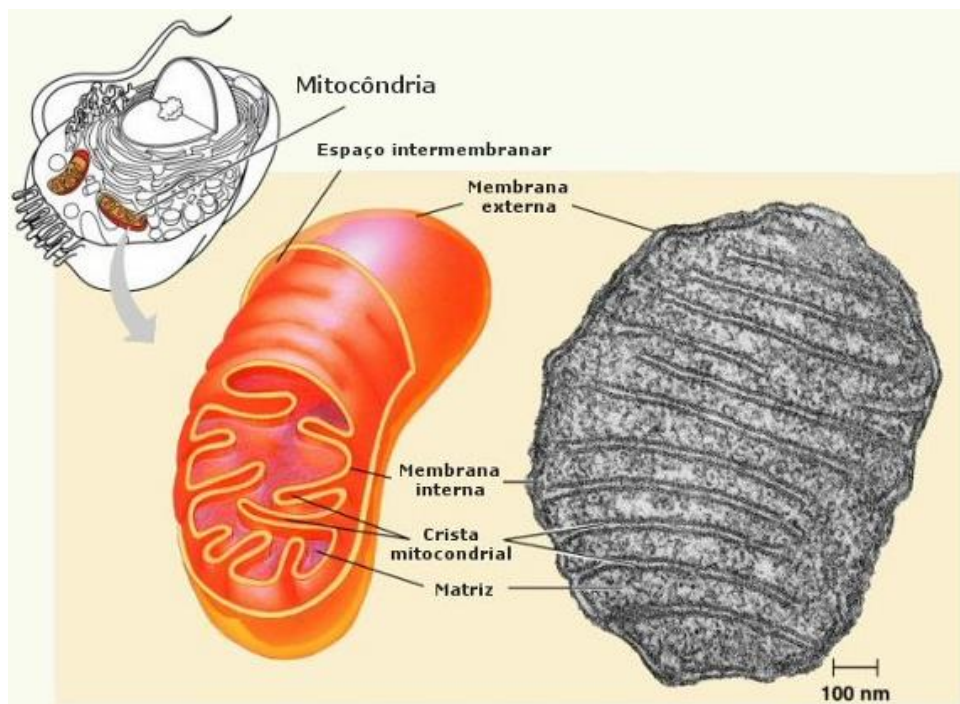


FIGURA 9- LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA MITOCÔNDRIA.

As mitocôndrias apresentam em sua constituição o espaço intermembranar, a membrana externa e interna, a crista mitocondrial e a matriz.

FONTE: <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/modules>

Como as mitocôndrias são as principais fontes celulares de radicais livres, tem sido proposta uma teoria mitocondrial de envelhecimento, a qual sugere que tanto a mitocôndria quanto o mtDNA podem ser alvos importantes dos danos induzidos pelos radicais livres (GREAVES e TURNBULL, 2009).

A mitocôndria é o único sítio intracelular, em células animais, que apresenta DNA extra cromosomal e que está sob o controle genético tanto do DNA nuclear quanto do genoma mitocondrial. O genoma mitocondrial consiste de múltiplas cópias de moléculas de DNA dupla fita circular (16,6kb) e é susceptível às várias mutações (GREAVES e TURNBULL, 2009; TANG e HUANG, 2010). O mtDNA codifica 37 genes, incluindo 13 polipeptídios essenciais para o sistema da fosforilação oxidativa e toda a maquinaria necessária para a tradução dentro da organela representada por 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs transportadores (TAYLOR e TURNBULL, 2005). O mtDNA não apresenta íntrons e os genes possuem pouca ou nenhuma base não-

codificadora (ANDERSON *et al.*, 1981). A figura 10 apresenta de forma esquemática a estrutura do DNA mitocondrial.

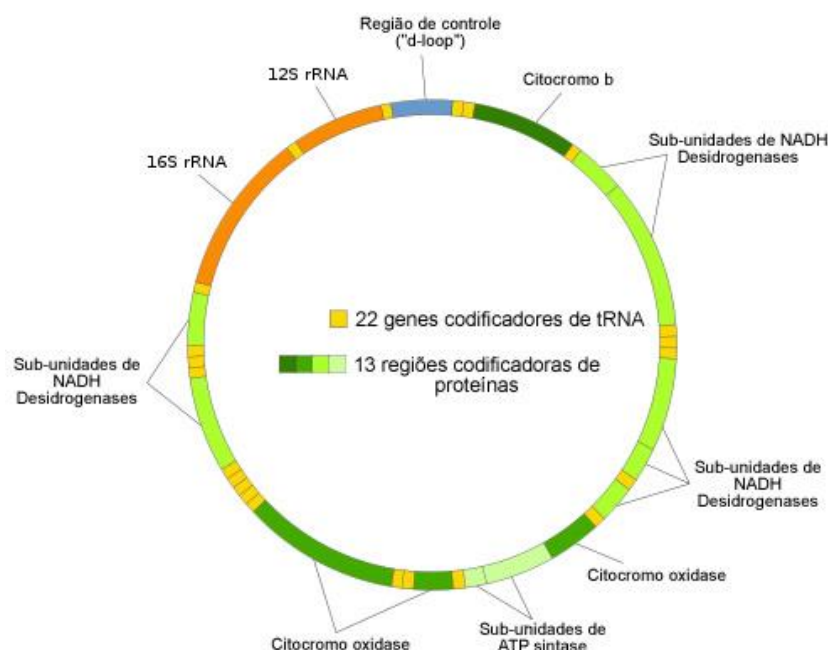


FIGURA 10- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO DNA MITOCONDRIAL (DNA DUPLA FITA CIRCULAR).

As codificações ao lado da figura representam os genes e subunidades do mtDNA.

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal; NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; ATP: adenosina trifosfato; tRNA: ácido ribonucleico transportador.

FONTE: Adaptado de UNSW Cell Biology, 2008.

Uma importante característica da genética mitocondrial é a homoplasmia e a heteroplasmia. A homoplasmia ocorre quando todas as cópias do genoma mitocondrial são idênticas e heteroplasmia quando existe uma mistura de dois ou mais genótipos mitocondriais. A importância destes termos é evidente quando se consideram mutações no mtDNA que levam a doenças. Algumas mutações afetam todas as cópias do genoma mitocondrial (mutações homoplásmicas) enquanto outras estão presentes apenas em algumas cópias do genoma mitocondrial (mutações heteroplásmicas), em diferentes níveis coexistindo com o mtDNA selvagem (Figura 11). A expressão da doença é determinada pela proporção entre a homo e a heteroplasmia (SPINAZZOLA e ZEVIANI, 2009).

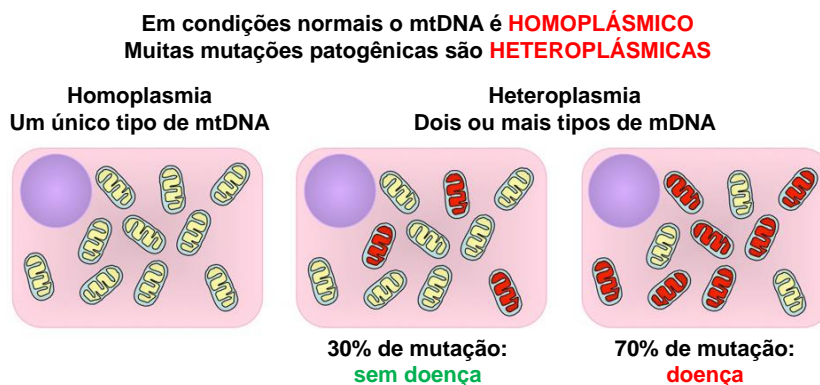


FIGURA 11- HOMOPLASMIA E HETEROPLASMIA NO mtDNA.

O mtDNA em condições normais é homoplásmico, apresenta cópias idênticas em todo o genoma. Quando mutações estão presentes, há uma alteração no genoma mitocondrial, que pode passar a apresentar determinada doença ou não. A manifestação da doença é determinada pela proporção de homoplasma e heteroplasma presentes nas mitocôndrias.

FONTE: Adaptado de (SPINAZZOLA e ZEVIANI, 2009).

O modelo padrão de herança mitocondrial remete sua transmissão estritamente através da linhagem materna e que linhagens de DNA mitocondrial são, portanto, clonais (GILES *et al.*, 1980). Existem evidências de que a recombinação tem contribuído para a distribuição dos polimorfismos no mtDNA na população humana (AWADALLA; EYRE-WALKER e SMITH, 1999). Com exceção do músculo esquelético, os demais tecidos contêm um único haplótipo de mtDNA de origem materna (TAYLOR e TURNBULL, 2005).

O aconselhamento genético atual é de que os pais com mutações no mtDNA não correm risco de transmitir o defeito aos seus descendentes. A transmissão materna de mutações no mtDNA ocorre, mas o risco depende do tipo de mutação e possivelmente da segregação da mutação nos tecidos maternos (TAYLOR e TURNBULL, 2005). Mutações homoplásmicas no mtDNA são transmitidas à toda descendência materna. Apesar de todos os descendentes herdarem a mutação, apenas alguns desenvolverão a doença. A transmissão de mutações heteroplásmicas pontuais no mtDNA é ainda mais complexa. A genética nuclear e fatores ambientais quase sempre afetam a expressão do fenótipo da doença (BATTERSBY; LOREDO-OSTI e SHOUBRIDGE, 2003).

As doenças de herança mitocondrial afetam vários tecidos e suas características clínicas são muito variáveis, o que torna difícil definir o impacto das mutações na saúde humana. A figura 12 apresenta os possíveis mecanismos

envolvidos na disfunção da mitocôndria, que levam ao aparecimento de doenças e do envelhecimento. Uma classificação baseada nas características clínicas define a extensão do problema:

- Síndromes clássicas no mtDNA;
- Síndromes clínicas com alto risco de mutações no mtDNA;
- Envolvimento em fenótipo de doença comum;
- mtDNA como uma predisposição para doença comum e envelhecimento.

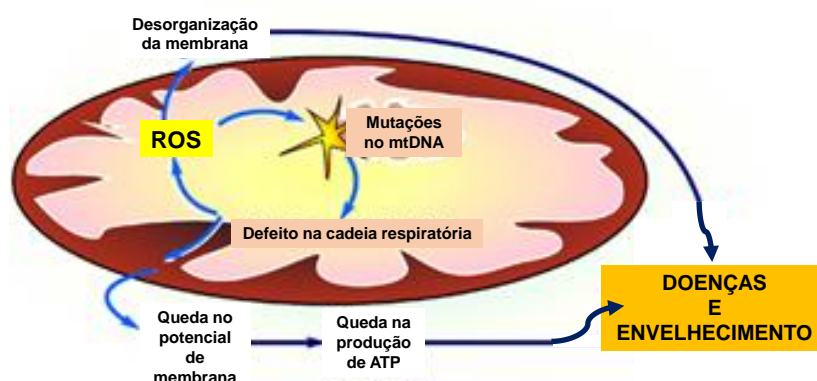


FIGURA 12- MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DISFUNÇÃO DA MITOCÔNDRIA QUE DESENCADÉIAM DOENÇAS E O ENVELHECIMENTO.

Mutações no mtDNA produzem defeitos na cadeia respiratória e promovem alterações mitocondriais que aceleram a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Como consequência, há queda no potencial de membrana e na produção de ATP pela mitocôndria, o que gera doenças e o envelhecimento. As ROS produzem, de forma independente, uma desorganização da membrana, favorecendo o aparecimento de doenças e o envelhecimento.

Fonte: Ward Dean. Mitochondrial Restoration, Part I Dysfunction, Nutrition and Aging, 2000.

As células β pancreáticas identificam alterações na glicemia e secretam insulina a fim de manter a normoglicemia. A sensibilidade à glucose nas células β pancreáticas é amplamente controlada pela atividade da glucoquinase e pelo metabolismo mitocondrial, o qual estimula a cadeia respiratória e a consequente produção de ATP através da fosforilação oxidativa. O metabolismo mitocondrial oxidativo inadequado bloqueia a secreção de insulina induzida pela glucose, através da queda de produção de ATP, podendo levar ao aparecimento do diabetes (LOWELL e SHULMAN, 2005; LU *et al.*, 2010).

As formas monogênicas de diabetes compreendem as várias formas do diabetes da maturidade de início precoce (MODY) e o diabetes mitocondrial, também denominado de diabetes de herança materna e surdez (MIDD) (MAASSEN e KADOWAKI, 1996).

O diabetes mitocondrial se desenvolve associado ao envelhecimento com idade média de aparecimento entre 35 e 40 anos. Este processo, relacionado ao envelhecimento, contribui para uma gradual deterioração da função da célula β (MAASSEN *et al.*, 2004). Essa função deteriorada prejudica a secreção de insulina como mencionado anteriormente (MAECHLER e WOLLHEIM, 2001). Nesse tipo de diabetes não há resistência à insulina e frequentemente é de fácil controle com medidas dietéticas e/ou uso de hipoglicemiantes orais, entretanto eventualmente, a maioria dos pacientes necessita de insulinoterapia. A audição é prejudicada, com diminuição da percepção de frequências superiores a 5kHz (SCHIFF *et al.*, 2009).

A variante A3243G do mtDNA responde por 1-2% dos casos de diabetes em adultos, e a maioria dos portadores da variante desenvolvem diabetes durante a vida adulta (GUILLAUSSEAU *et al.*, 2001). A variante é heteroplásmica, o alelo mutante e o alelo selvagem co-ocorrem na mitocôndria e a proporção de mtDNA mutado varia entre os pacientes e entre os tecidos (ZEVIANI e DONATO, 2004). A heteroplasmia é conhecida por modificar o fenótipo da doença em pacientes portadores da variante (CHINNERY *et al.*, 2000).

A síndrome de encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios de acidente vascular encefálico (MELAS), é caracterizada por deficiências neurológicas focais recorrentes, epilepsia e baixa estatura (SCAGLIA e NORTHROP, 2006). A variante A3243G, localizada no RNA transportador de leucina (tRNA^{Leu}) do mtDNA, está presente em 80% dos pacientes que apresentam a síndrome. Sua prevalência é de 1 em 6000 na população geral e mais alta em populações específicas (MANWARING *et al.*, 2007). Esta variante também foi associada ao diabetes herdado maternalmente e surdez nervosa (MIDD) que resulta em disfunção das células β e secreção prejudicada de insulina (KISHIMOTO *et al.*, 1995). Estes dados sugerem que esta variante pode estar presente com uma variedade de manifestações de doença (ALLAN *et al.*, 1997).

3.8 Gene *ADRA2A*

Receptores alfa-2-adrenérgicos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (DELITALA *et al.*, 1994). A família é composta por três subtipos altamente homólogos: alfa 2A, alfa 2B e alfa 2C (BYLUND, 2005). São expressos primariamente no sistema nervoso e nas plaquetas (DORN, 2010). Estes receptores têm um papel crítico na regulação da liberação de neurotransmissores a partir de nervos simpáticos e de neurônios adrenérgicos no sistema nervoso central. Os ligantes endógenos, adrenalina e noradrenalina ativam estes receptores (PINTO; GUIDA-CARDOSO e AREAS, 2005).

Os receptores do tipo alfa2 possuem ações específicas que incluem:

- Agregação plaquetária;
- Regulação do fluxo simpático a partir do sistema nervoso central;
- Recaptação de noradrenalina;
- Inibição da insulina no pâncreas;
- Indução da liberação de glucagon no pâncreas;
- Contração dos esfíncteres do trato gastrointestinal;
- *Feedback* negativo nas sinapses neuronais.

(SCHMITZ *et al.*, 1981; BELFER *et al.*, 2005).

O gene *ADRA2A* está localizado no cromossomo 10q24-q26 (SMALL *et al.*, 2000), codifica o subtipo alfa 2A dos receptores, não contém íntrons e apresenta 3,7kb de comprimento (NCBI, Gene ID 150).

O receptor alfa-2A é expresso nas células β e a sua ativação leva à saída de potássio independente do canal de potássio ATP-dependente, possivelmente modificando a liberação de insulina (RORSMAN *et al.*, 1991).

Modelos animais de super expressão de *ADRA2A* em células β pancreáticas, resultaram em intolerância à glucose (DEVEDJIAN *et al.*, 2000), enquanto que o nocaute do gene aumentou a secreção de insulina (FAGERHOLM *et al.*, 2004), o que indica que o gene *ADRA2A* é um candidato para o diabetes tipo 2.

Uma meta análise de estudos de associação de genoma amplo (GWAS) identificou que a variante rs10885122 do gene está associada com baixos níveis de glucose em jejum (DUPUIS *et al.*, 2010). Outro estudo apontou associação do polimorfismo com a redução da liberação de insulina estimulada pela glucose

(BOESGAARD *et al.*, 2010). Entretanto, Dupuis *et al.* (2010) e Talmud *et al.* (2011) não observaram uma associação da variante com o diabetes tipo 2.

Esta variante, rs10885122, está localizada a 0,2Mb de distância do *locus* mais próximo, em uma região do genoma conhecida como “deserto gênico”, designação que caracteriza regiões desprovidas de genes codificadores de proteínas (DUPUIS *et al.*, 2010).

Rosengren *et al.* (2010) demonstraram que uma única variante (rs553668) na região 3' UTR (região não-traduzida do gene) foi associada a uma modesta redução da secreção de insulina e a um risco aumentado de diabetes tipo 2.

O mecanismo de regulação da exocitose de insulina pelos receptores alfa-2 adrenérgicos está apresentado na figura 13.

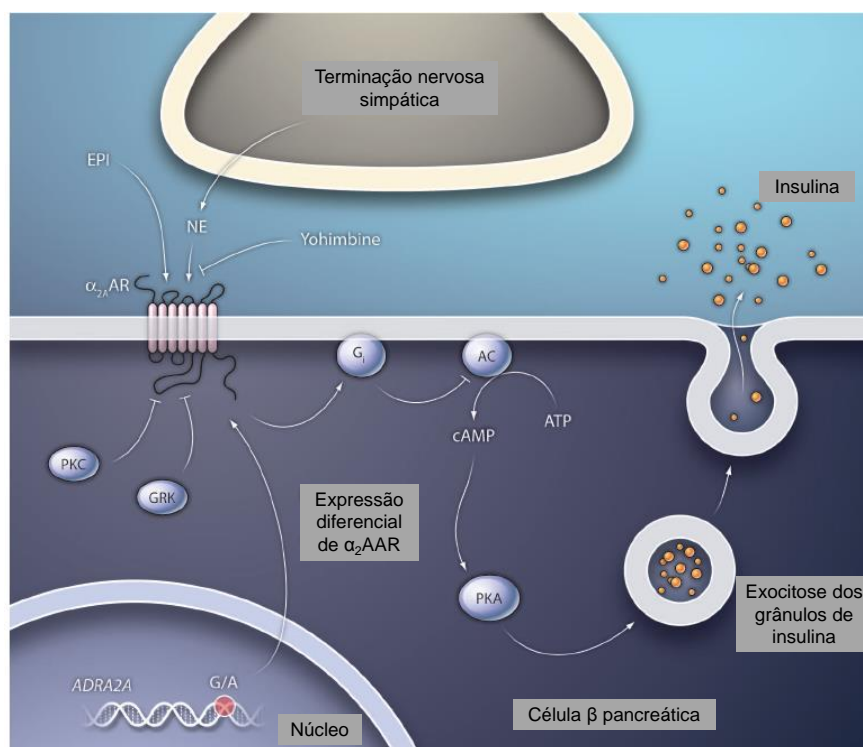


FIGURA 13- MECANISMO DE REGULAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA PELOS RECEPTORES ALFA-2 ADRENÉRGICOS.

A via pela qual o receptor alfa-2 adrenérgico expresso em células β pancreáticas inibe a secreção de insulina por níveis de modulação de cAMP é apresentada. A ativação destes receptores por norepinefrina neuronal (NE) ou epinefrina circulante (EPI), ou por ativação espontânea, resulta em acoplamento do G_i -receptor que inibe a adenilato ciclase (AC). Esta inibição, por sua vez, resulta na diminuição da conversão de ATP em cAMP e na redução da proteína quinase A (PKA), a qual media a exocitose de grânulos de insulina. O alelo A da variante rs553668 do gene *ADRA2A* está associado com o aumento de expressão α_2 AAR na célula β , que amplifica a sinalização do efeito inibitório do α_2 AAR e está associada com a secreção de insulina reduzida e com o diabetes tipo 2.

FONTE: (LIGGETT, 2009).

Estudos demonstram o envolvimento do gene *ADRA2A* com o diabetes tipo 2 e com a diminuição da secreção de insulina em diferentes países e raças (TALMUD *et al.*, 2011; REES *et al.*, 2011; FUJITA *et al.*, 2012). Entretanto, estes estudos apresentam resultados conflitantes.

A investigação do envolvimento deste gene no DMG não foi avaliada até o presente momento, o que reforça o estudo deste gene em nossa população, uma vez que ele apresenta um envolvimento na secreção de insulina e que no DM2 sua associação já foi detectada.

3.9 Gene *KCNQ1*

A secreção de insulina nas células β do pâncreas é regulada pela complexa interação entre os canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}), os canais de potássio dependentes de voltagem (K_V -) e os canais de potássio dependentes de Ca^{++} (MACDONALD e WHEELER, 2003). Mecanismos iônicos nos canais de K_{ATP} e K_V - são essencialmente importantes no desencadeamento e manutenção da secreção de insulina estimulada pela glucose (BEEN *et al.*, 2011).

O gene *KCNQ1* está localizado no cromossomo 11p15.5, é composto por 16 exons e tem 404kb de comprimento (NEYROUD *et al.*, 1999). Codifica a subunidade alfa dos canais de potássio, que é expresso em uma grande variedade de tecidos: coração, estômago, intestino delgado e grosso, rins e pâncreas (ROBBINS, 2001; ZHOU *et al.*, 2009). Este gene é conhecido por desempenhar um papel importante no controle do processo de repolarização ventricular (SHIN *et al.*, 2010). É expresso em células secretoras de insulina e a sua inibição aumenta significativamente a secreção de insulina, apontando para um papel regulador destes canais para a liberação de insulina induzida pela glucose (ULLRICH *et al.*, 2005).

Estudos recentes em diversas populações (chineses, coreanos, suecos e dinamarqueses) tem apontado forte associação do gene *KCNQ1* com a susceptibilidade ao diabetes tipo 2 (LEE *et al.*, 2008; UNOKI *et al.*, 2008; YASUDA *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2009, p. 1; JONSSON *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009; QI *et al.*, 2009). Os SNPs do gene afetam o metabolismo da glucose, possivelmente através da diminuição da secreção de insulina (MUSSIG *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2009).

Zhou e colaboradores (2009) apontaram uma forte associação entre os polimorfismos do gene *KCNQ1* e o diabetes gestacional (ZHOU *et al.*, 2009). Esta

associação pode estar relacionada ao comprometimento da função das células β , entretanto o mecanismo exato ainda é desconhecido.

Três polimorfismos principais do gene *KCNQ1* (rs2074196, rs2237892, rs2237895) têm sido associados à maior susceptibilidade ao diabetes tipo 2 (YASUDA *et al.*, 2008). Em especial, o alelo de risco do polimorfismo rs2237892 foi associado à redução na secreção de insulina, a qual pode ser mediada por algum efeito na função das células β , e foi associado também ao diabetes tipo 2 e a um risco aumentado de diabetes gestacional (LEE *et al.*, 2008; UNOKI *et al.*, 2008; YASUDA *et al.*, 2008; JONSSON *et al.*, 2009).

As variantes do gene *KCNQ1* podem também ter um efeito sobre o metabolismo de lipídeos. Foi descrita uma associação entre o alelo de risco (C) do polimorfismo rs2237892 com um maior nível de colesterol total e houve uma tendência de aumento nos níveis de LDL em portadores do mesmo alelo (C) (VAN VLIET-OSTAPTCHOUK *et al.*, 2012). Chen e colaboradores (2010) reportaram uma associação das variantes do gene *KCNQ1* com altos níveis de triglicérides e baixos níveis de HDL-C (CHEN *et al.*, 2010). O mecanismo pelo qual as variantes deste gene se associam ao metabolismo lipídico não é claro, estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos.

3.10 Gene *PPARg*

Os PPARs são fatores de transcrição que pertencem à superfamília de receptores nucleares hormonais. Este grupo é constituído por 50 fatores de transcrição que atuam em diferentes processos biológicos, os quais são alvos importantes para o desenvolvimento de novas drogas (DUBUQUOY *et al.*, 2002)

PPAR α foi o primeiro a ser descrito como um receptor que é ativado por proliferadores de peroxissoma (ISSEMAN e GREEN, 1990). Em 1992, Dreyer e colaboradores encontraram e caracterizaram dois isótopos adicionais relacionados, PPAR δ e PPAR γ (*PPARg*).

O *PPARg*, receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma, é membro da subfamília de receptor de hormônio nuclear e desempenha um papel importante na diferenciação do tecido adiposo (adipogênese) e na sensibilização à insulina (HEUDE *et al.*, 2011).

O *PPARg* tem sido associado a diversas patologias, como obesidade, diabetes (WALCZAK e TONTONAZ, 2002), aterosclerose (HSUEH e LAW, 2001), artrite reumatoide (JI *et al.*, 2001), mal de Alzheimer (LANDRETH e HENKA, 2001), câncer de mama (PIGNATELLI *et al.*, 2001) e de cólon (AUWERX, 2002) e doenças digestivas inflamatórias (LEWIS *et al.*, 2001). Agonistas do *PPARg* têm sido utilizados no tratamento da dislipidemia e hiperglicemia (LI *et al.*, 2008).

A ativação do *PPARg* requer a formação de heterodímeros com outro receptor nuclear, o receptor retinóide X (RXR). Estes heterodímeros (*PPARg*/RXR) são expressos no trato intestinal, no pâncreas e no fígado. Apresentam efeitos anti-inflamatórios e atuam na regulação da transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e glucose, no transporte de ácidos graxos, na diferenciação de adipócitos, carcinogênese e inflamação (FAJAS *et al.*, 1997; SPIEGELMAN, 1998; DUBOIS *et al.*, 2000; MEIRHAEGHE *et al.*, 2007).

A ativação do *PPARg* desencadeia uma série de reações no organismo bem como efeitos adversos. A tabela 6 apresenta os efeitos conhecidos associados à esta ativação.

TABELA 6- EFEITOS BIOLÓGICOS DA ATIVAÇÃO DO *PPARg*.

Órgão/ tecido	Efeito	
	Benéfico	Adverso
Pâncreas	↑ Secreção de insulina estimulada pela glucose	-
Fígado	↑ Gliconeogênese	↑ Armazenamento de lipídeos
Tec. Adiposo	↑ Metabolismo de lipídeos ↑ Homeostase de glucose	↑ Adipogênese
Cérebro	↓ Inflamação	↑ Ingestão de alimentos
Músculo esquelético	↑ Sensibilização à insulina	-
Coração	↓ Inflamação	↑ Armazenamento de lipídeos
Rins	↓ Nefropatia diabética	↑ Retenção de sódio e fluidos
Osso	-	↓ Osteoblastogênese ↑ Osteoclastogênese

FONTE: Adaptado de AHMADIAN *et al.*, 2013.

As vias de sinalização da *PPARg* afetam tanto o metabolismo sistêmico quanto celular dos lipídeos e tem ligação com a obesidade, diabetes e doença cardiovascular (WALCZAK e TONTONZOZ, 2002). Existem duas isoformas, gama-1 e gama-2, geradas por promotores alternativos e *splicing* diferencial de pelo menos três diferentes transcritos a partir do gene *PPARg* no cromossomo 3p25. *PPARg*-2 é a isoforma mais importante no tecido adiposo, onde é quase que exclusivamente expressa (FARMER, 2003). A expressão da isoforma *PPARg*3 é restrita ao epitélio do cólon e ao tecido adiposo.

Mutações frequentes no gene *PPARg* têm sido descritas associadas à obesidade e a fenótipos relacionados ao diabetes (DEEB *et al.*, 1998; MEIRHAEGHE *et al.*, 1998; DONEY *et al.*, 2004).

Um polimorfismo comum do gene *PPARg*, localizado no códon 12 do exon B (C>G, Pro12Ala, rs1801282), tem sido associado a uma modificação no risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 bem como ao controle da massa de gordura em diversas populações adultas (MEIRHAEGHE e AMOUYEL, 2004). Este polimorfismo é caracterizado como uma variação funcional, e a presença do alelo menos frequente está associada a uma redução da atividade do *PPARg* (DEEB *et al.*, 1998).

O alelo menos frequente do polimorfismo rs1801282 foi associado com baixo peso do feto ao nascimento, causado primariamente pela menor duração da gestação. O polimorfismo pode representar um fator de susceptibilidade genética para o nascimento prematuro e constitui um elo entre o nascimento prematuro e doenças metabólicas ao longo da vida do indivíduo (MEIRHAEGHE *et al.*, 2007).

Alguns estudos descritos na literatura não encontraram associação do polimorfismo rs1801282 com o diabetes gestacional (LAUENBORG *et al.*, 2009; PAPPA *et al.*, 2011). Heude e colaboradores (2011) ao estudar este polimorfismo em conjunto com o polimorfismo C1431T encontraram associação com o diabetes gestacional. Quando estavam presentes o alelo menos frequente do polimorfismo rs1801282 e o alelo C do polimorfismo C1431T (haplótipo Ala-C), foi observado um efeito protetor para o desenvolvimento de diabetes gestacional.

3.11 Gene *SLC2A2*

O gene *SLC2A2*, também conhecido como GLUT2 (transportador de glucose 2), codifica uma proteína transmembrana que atua facilitando o transporte de glucose através das membranas celulares (FAJANS; BELL e POLONSKY, 2001; KRONENBERG *et al.*, 2008). Este transporte facilitado afeta a secreção de insulina através da regulação da entrada de glucose na célula β do pâncreas (KILPELAINEN *et al.*, 2007).

Mutações no GLUT2 causam a Síndrome de Fanconi-Bickel (FBS), caracterizada por hipercolesterolemia e hiperlipidemia (IGL *et al.*, 2010). Uma dieta rica em gordura provoca diminuição na expressão do GLUT2 nas ilhotas β pancreáticas. Como resultado, a exocitose de insulina estimulada pela glucose é prejudicada provocando hiperglicemia, característica clínica do diabetes (IGL *et al.*, 2010).

Os níveis de expressão do GLUT2 são modestos nas ilhotas pancreáticas de humanos, sendo a expressão do GLUT1 e GLUT3 bem mais expressiva (MCCULLOCH *et al.*, 2011). A caracterização fisiológica detalhada das variantes do gene *SLC2A2* não detectou qualquer efeito demonstrável na função das células β (NOLAN e PRENTKI, 2008; DUPUIS *et al.*, 2010; HUSSAIN, 2010). Um estudo recente demonstrou que é improvável que o GLUT2 seja o principal transportador de glucose nas células β e que defeitos neste gene, em outros tecidos metabólicos, levam à diferença nos níveis de glucose entre os portadores de variantes no gene *SLC2A2* (MCCULLOCH *et al.*, 2011).

Polimorfismos no gene *SLC2A2* foram associados com a conversão de intolerantes à glucose em diabéticos tipo 2, em uma população de Finlandeses (LAUKKANEN *et al.*, 2004, 2005). A figura 14 apresenta a localização das principais variantes no gene bem como a variante rs5393 analisada neste estudo.

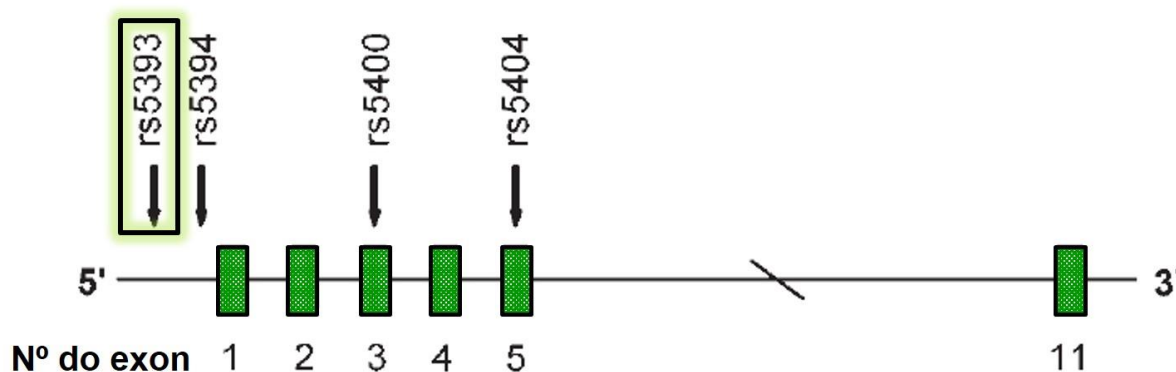


FIGURA 14- LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS VARIANTES DO GENE SLC2A2.

Os quadrados em verde representam os exons do gene e a variante rs5393 analisada está destacada.

FONTE: Adaptado de KILPELAINEN *et al.*, 2007.

3.12 Gene *ABCC8*

Os transportadores da família ABC utilizam o ATP (*ATP-binding cassette*) para facilitar o transporte transmembrana de diversas moléculas biológicas importantes para a manutenção da vida (DEAN, 2005). Estes transportadores são fundamentais para uma série de processos biológicos como a biossíntese do heme; formação do complexo [Fe-S]; apresentação de antígeno e secreção de insulina (RIORDAN *et al.*, 1989; CHENG *et al.*, 1990). As proteínas transportadoras do tipo ABC possuem como característica domínios de ligação de nucleotídeos (NBDs) (AITTONIEMI *et al.*, 2009).

Algumas mutações pontuais em genes do tipo ABC produzem alteração apenas na especificidade do substrato, enquanto outras causam profundas mudanças conformacionais que alteram o mecanismo de transporte de moléculas (CHENG *et al.*, 1990).

O gene *ABCC8* é responsável por codificar o receptor de sulfoniluréia 1 (SUR-1) (THOMAS *et al.*, 1995; DE LEON e STANLEY, 2007). SUR-1 e Kir6.2 (codificado pelo gene *KCNJ11*) se combinam para formar o canal de potássio sensível a ATP (K_{ATP}) presente na membrana plasmática das células β pancreáticas e responsável pela secreção de insulina das células β (ASHCROFT, 1988). O canal é um complexo macromolecular grande, hetero-octamérico, composto de quatro subunidades Kir6.2, as quais formam o poro iônico, acoplado a quatro subunidades reguladoras SUR-1 (CLEMENT *et al.*, 1997; DUNNE *et al.*, 2004; MIKHAILOV *et al.*,

2005). Os canais regulam o fluxo de íons K^+ através das membranas celulares e ligam o metabolismo celular à atividade elétrica. Esta atividade elétrica pode promover a contração muscular e a liberação de hormônios neurotransmissores (FLANAGAN *et al.*, 2009).

A regulação metabólica do canal de K_{ATP} é mediada por alterações intracelulares na concentração de ATP e de MgADP, os quais inibem ou ativam o canal, respectivamente (ASHCROFT, 1988; AGUILAR-BRYAN e BRYAN, 1999). As sulfoniluréias e o diazóxido se ligam às subunidades SUR-1 para fechar (sulfoniluréias) ou abrir (diazóxido) os canais, independentemente das concentrações de ATP/ADP e para estimular ou inibir a secreção de insulina (FLANAGAN *et al.*, 2011).

Altas concentrações plasmáticas de glucose via glicólise e/ou metabolismo mitocondrial aumentam a relação ATP/ADP e promovem o fechamento do canal K_{ATP} (VIEIRA *et al.*, 2010). Por outro lado quando os níveis de glucose diminuem, os canais são abertos suprimindo a atividade elétrica e a secreção de insulina (MANNIKKO *et al.*, 2011).

Algumas mutações inativam o canal de K_{ATP} o que resulta no seu fechamento constitutivo e na consequente despolarização da membrana. Essa despolarização favorece o influxo de Ca^{+2} na célula β , resultando na secreção de insulina por essa célula. Essas mutações podem causar hiperinsulinismo do canal, a forma mais grave e comum de hiperinsulinismo (CARTIER *et al.*, 2001; DUNNE *et al.*, 2004).

Já foram descritas na literatura mais de cem mutações no gene *ABCC8*. Algumas eliminam totalmente a atividade do canal enquanto outras alteram a sua densidade ou a sua resposta a nucleotídeos (FOURNET e JUNIEN, 2003). Em 2009, Flanagan e colaboradores reportaram um total de 202 mutações no gene *ABCC8* em famílias com hiperinsulinismo infantil, *diabetes mellitus* permanente do neonato, *diabetes mellitus* neonatal transitório e com síndrome DEND (atraso no desenvolvimento, epilepsia e diabetes neonatal) (FLANAGAN *et al.*, 2009).

As mutações que levam a um ganho na função das subunidades Kir6.2 ou SUR-1 nos canais de K_{ATP} são uma causa comum de diabetes neonatal, doença hereditária rara que é caracterizada pela manifestação do diabetes durante os seis primeiros meses de vida (GLOYN *et al.*, 2004; HATTERSLEY e ASHCROFT, 2005; FLANAGAN *et al.*, 2007).

As mutações que levam à perda de função das subunidades Kir6.2 ou SUR-1 dão origem ao hiperinsulinismo congênito, caracterizado por secreção de insulina contínua e não regulada, apesar dos níveis muito baixos de glucose no plasma (HUOPIO *et al.*, 2000, 2003; DE LEON e STANLEY, 2007; PINNEY *et al.*, 2008).

Os genótipos mais comuns das variantes do gene *ABCC8*, bem como no gene *KCNJ11*, podem levar a um fenótipo variável de hipoglicemia hiperinsulinêmica (HH), intolerância à glucose e *diabetes mellitus* na vida adulta (FLANAGAN *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual essas mutações levam à intolerância à glucose e ao *diabetes mellitus* ainda não é claro, possíveis explicações incluem falência progressiva na função das células β devido à exaustão; aumento da apoptose das células β como resultado da grande concentração de Ca^{+2} intracelular e a interferência de outros fatores genéticos ou ambientais (FLANAGAN *et al.*, 2011).

O polimorfismo rs3758947, localizado na região promotora do gene, foi associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (KILPELAINEN *et al.*, 2007). A figura 15 apresenta a localização das principais variantes do gene *ABCC8*, incluindo a variante rs3758947.

Apesar dos muitos dados a respeito de polimorfismos no gene *ABCC8* e o seu envolvimento com a secreção de insulina e o desenvolvimento de diabetes, pouco ainda se sabe sobre o envolvimento do gene com o diabetes gestacional. Este dado justifica o estudo deste gene em gestantes com este tipo de diabetes (DMG).

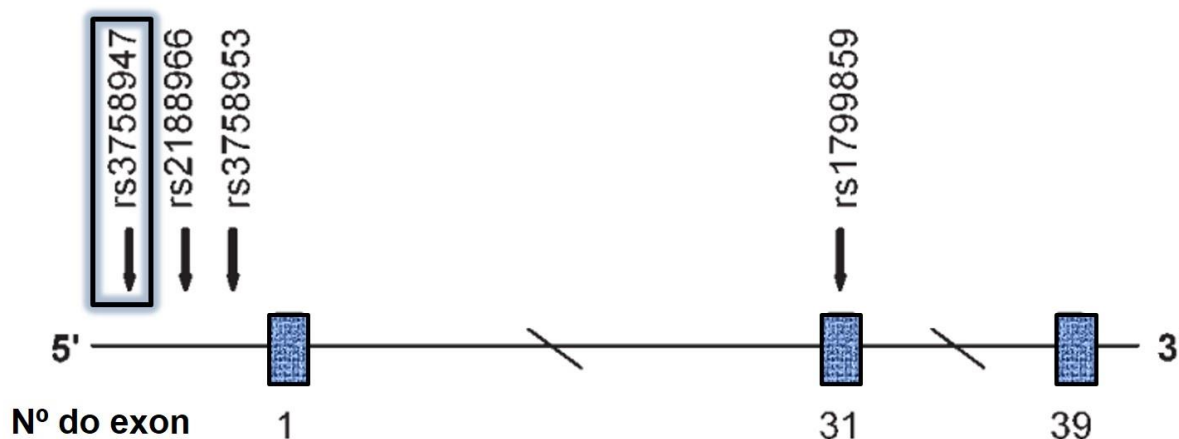


FIGURA 15- LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS VARIANTES DO GENE *ABCC8*.

Os exons estão representados pelos quadrados azuis e a variante rs3758947 analisada neste trabalho está em destaque.

FONTE: Adaptado de KILPELAINEN *et al.*, 2007.

A figura 16 apresenta o mecanismo de ação e o envolvimento dos genes, abordados neste trabalho, no diabetes através da secreção de insulina estimulada pela glucose.

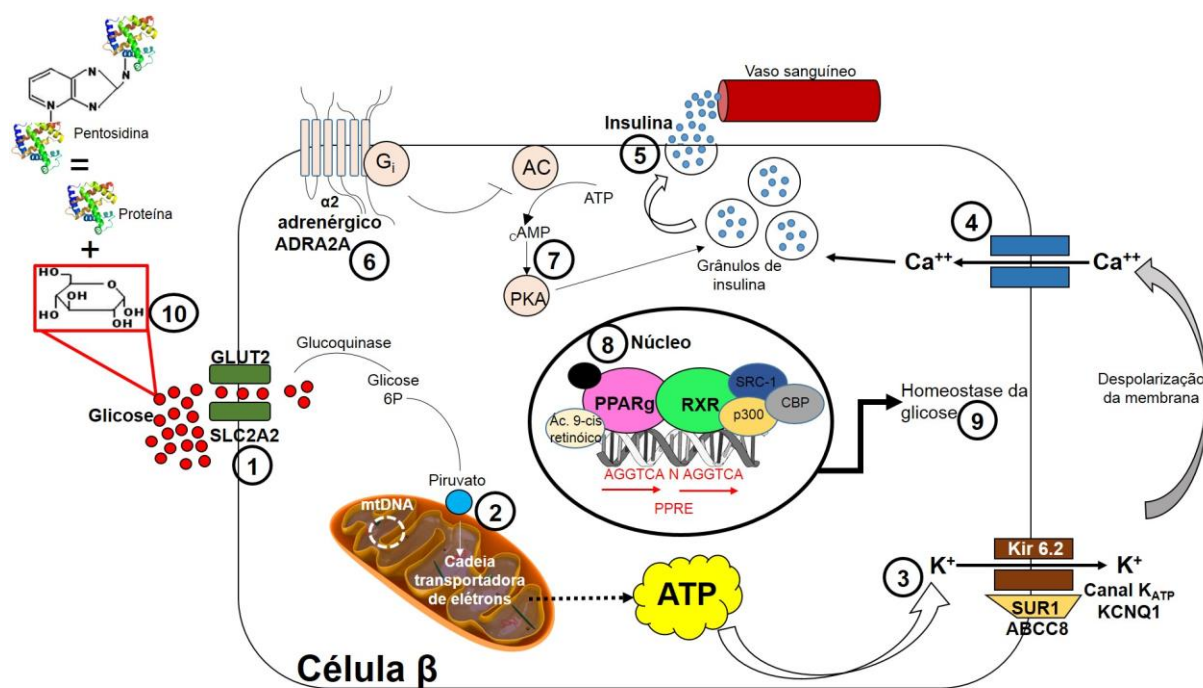


FIGURA 16- MECANISMO DE AÇÃO DOS GENES NA CÉLULA β PANCREÁTICA E SEU ENVOLVIMENTO NA SECREÇÃO DE INSULINA ESTIMULADA PELA GLUCOSE.

(1) A glucose proveniente da corrente sanguínea entra na célula através do seu transportador GLUT2, codificado pelo gene *SLC2A2*. A glucoquinase converte a glucose a glucose 6 fosfato e após uma cascata de reações é produzido o piruvato. (2) O piruvato entra na mitocôndria e através da cadeia transportadora de elétrons há produção de ATP. (3) O ATP inibe o canal de potássio dependente de ATP e composto por 8 subunidades. O gene *KCNQ1* codifica a subunidade α do canal e o gene *ABCC8* codifica o receptor de sulfonilureia (SUR1). Uma vez inibido o canal, o potássio permanece na célula, o que promove um aumento de cargas positivas no interior da célula que culmina com a despolarização da membrana e a abertura dos canais de cálcio. (4) O cálcio entra na célula e estimula a liberação de insulina a partir dos seus grânulos. (5) A insulina é então liberada para os vasos sanguíneos a fim de baixar a concentração de glucose no sangue. (6) O gene *ADRA2A* codifica o receptor $\alpha 2$ adrenérgico expresso nas células β pancreáticas. A ativação deste receptor por norepinefrina neuronal (NE) ou epinefrina circulante (EPI), ou por ativação espontânea, resulta em acoplamento do G_i -receptor que inibe a adenilato ciclase (AC). (7) Esta inibição, por sua vez, impede que a proteína quinase A (PKA) converta o ATP em cAMP. A PKA media a exocitose de grânulos de insulina. (8) O gene *PPARg* atua no núcleo da célula, forma heterodímeros com o receptor retinóide X (RXR) e se liga em uma região específica do DNA denominada de PPRE. A ligação de outras moléculas necessárias para sua ativação faz com que o (9) gene atue na regulação da transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e glucose. (10) A hiperglicemia favorece o processo de glicação das proteínas. Moléculas de glucose se ligam a grupamentos amina das proteínas formando os produtos de glicação avançada (AGEs).

FONTE: O autor.

3.13 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

O sistema de PCR em tempo real empregado nas análises foi o sistema TaqMan® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Este sistema utiliza sondas fluorescentes para a detecção do produto a ser amplificado. A presença de duas sondas em cada reação permite a genotipagem das duas variantes possíveis no SNP em uma sequência alvo. A técnica consegue quantificar a concentração do produto de PCR gerado a cada ciclo, ou seja, em tempo real (GINZINGER, 2002).

O ensaio de genotipagem TaqMan® consiste em um único tubo contendo dois iniciadores específicos (*primers*) com sequência complementar àquela do SNP de interesse e duas sondas alelo-específicas TaqMan® MGB para a detecção dos alelos do SNP de interesse.

A sonda empregada no sistema é composta por 20-26 bases e contém dois tipos de fluoróforos (partes fluorescentes de proteínas repórter) denominados de VIC e FAM na extremidade 5' e silenciador (*quencher*; Q) na extremidade 3' (*Applied Biosystems; User Guide*).

Cada sonda TaqMan® MGB contém: um corante VIC ligado à extremidade 5' da sonda do alelo 1; um corante FAM ligado à extremidade 5' da sonda do alelo 2. O alelo 1 VIC corresponde à primeira base designada no ensaio entre colchetes e o alelo 2 FAM corresponde à segunda base, por exemplo se a variante é representada como [C/A], o alelo 1 VIC corresponde à base C e o alelo 2 FAM à base A (*Applied Biosystems StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Genotyping Experiments*).

Um ligante do sulco menor (MGB) que aumenta a temperatura de fusão (T_m) para um dado comprimento da sonda, permite o desenho de sondas mais curtas (AFONINA *et al.*, 1997; KUTYAVIN *et al.*, 1997). O uso de sondas mais curtas resulta em maiores diferenças nos valores de T_m entre sondas pareadas e não pareadas e uma genotipagem mais robusta.

Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do silenciador reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante repórter através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço. Quando a sequência alvo está presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade exonuclease 5' da Taq DNA polimerase, enquanto o *primer* é estendido.

Quando ocorre esta clivagem há separação do fluoróforo repórter do fluoróforo silenciador, aumentando o sinal do corante repórter. Com a clivagem há também a remoção da sonda da fita alvo, permitindo assim que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde (HOLLAND *et al.*, 1991; HEID *et al.*, 1996).

Moléculas adicionais do corante repórter são clivadas de suas respectivas sondas a cada ciclo, resultando em um aumento na intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade do *amplicon* (produto) produzido.

A figura 17 apresenta o mecanismo da reação de PCR em tempo real.

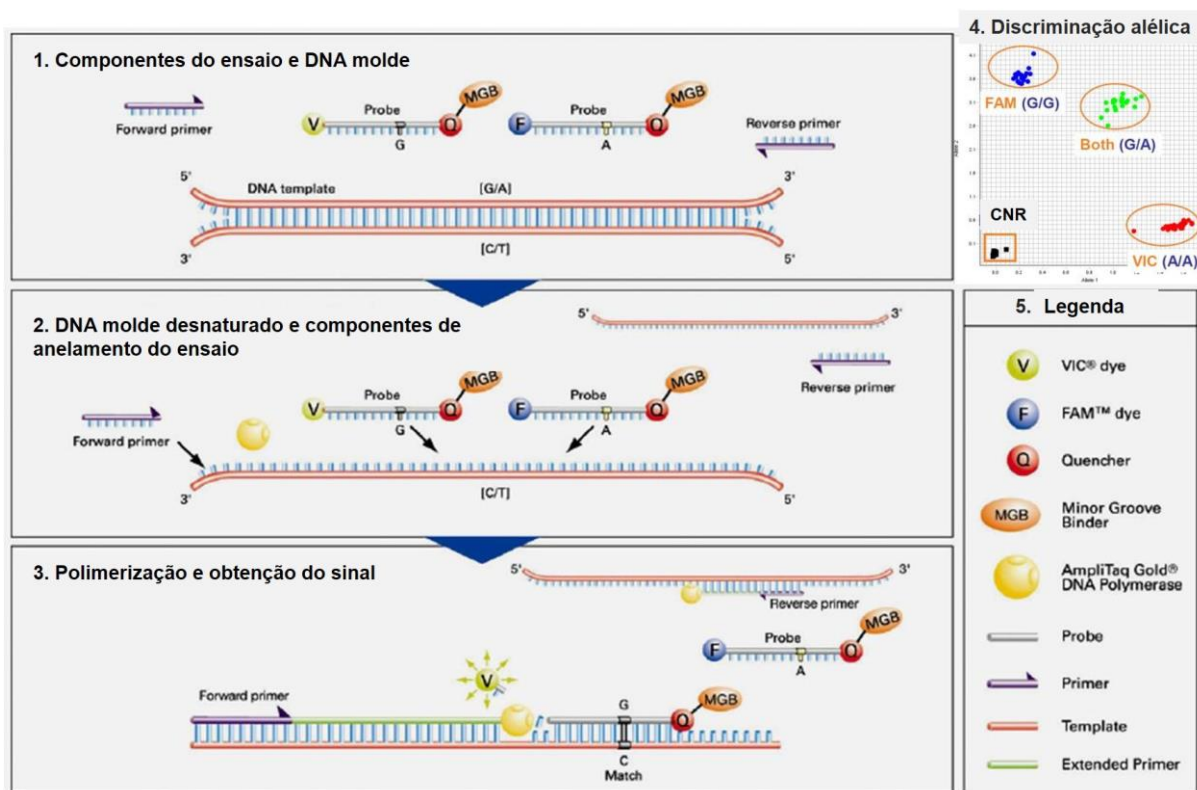


FIGURA 17- MECANISMO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.

1. São apresentados os componentes do ensaio de PCR em tempo real: os iniciadores (*primers forward e reverse*) e as sondas VIC e FAM; e o DNA molde.
2. O DNA molde foi desnaturado e está pronto para o anelamento dos iniciadores (*primers*) e da sonda correspondente à sequência alvo no DNA molde. Observa-se a presença da AmpliTaqGold® DNA polimerase nesta etapa.
3. Com a extensão do fragmento e após o anelamento da sonda na região alvo do DNA molde, há a clivagem da sonda hibridizada por ação da AmpliTaqGold® com a separação do corante repórter do silenciador, resultando em emissão de fluorescência correspondente ao alelo presente na amostra (VIC ou FAM).
4. Gráfico de discriminação alélica obtido na reação de PCR em tempo real. Em azul estão as amostras que apresentam o genótipo homozigoto usual (GG); em verde o genótipo heterozigoto (GA) e em vermelho estão as amostras com genótipo homozigoto raro (AA). Os quadrados inferiores pretos (CNR) representam os controles negativos da reação.
5. Legenda da figura indicando os componentes da reação: fluoróforos VIC e FAM, o silenciador (*quencher*), ligante do sulco menor (*minor groove binder*), AmpliTaqGold® DNA polimerase, sonda, iniciador (*primer*), molde (*template*) e fragmento de DNA amplificado (*extended primer*)

FONTE: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_046737.pdf

A principal diferença entre a PCR convencional e a PCR em tempo real é a capacidade de monitoramento da reação, o que permite de maneira mais rápida, a detecção de possíveis problemas ocorridos na amplificação das amostras.

A Tabela 7 apresenta as principais diferenças entre a PCR convencional e em tempo real.

TABELA 7- COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

PCR convencional	PCR em tempo real
Amplificação não específica;	Amplificação específica (uso de sondas) e análise da curva de melting;
	Monitoramento em tempo real; constante detecção dos produtos de amplificação durante a reação;
Requer maior concentração de DNA (em média 100ng/μL);	Requer menor concentração de DNA (3-20ng/μL);
Sujeito a maiores interferentes;	É mais sensível, específico e reprodutível;
	Ciclos são mais rápidos; maior extensão dinâmica;
A detecção do produto é feita em gel de agarose após o término da reação de amplificação;	Elimina os processamentos pós-amplificação, reduzindo a manipulação das amostras;
Maior manipulação das amostras.	Equipamento mais caro e suporte de alto custo.

FONTE: (HIGUCHI *et al.*, 1993; GINZINGER, 2002; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004; *Applied Biosystems*, 2011).

O sistema em tempo real consiste de um termociclador conectado a um sistema óptico para a excitação de fluorescência e captura de emissão, bem como de um software que permite a análise dos dados (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

A captação do sinal ocorre a cada 8,5 segundos, durante 25 milissegundos ao longo dos ciclos de PCR. A diferença na quantidade de emissão de fluorescência do emissor (repórter) com a absorção pelo inibidor (silenciador) produz um valor chamado de ΔR_n (R/Q) que reflete a quantidade de sonda hibridizada que foi clivada pela *Taq* DNA polimerase. O algoritmo computacional calcula a média dos valores de ΔR_n coletados nos últimos três ciclos de extensão, produzindo uma representação gráfica de amplificação (*amplification plot*) onde a abcissa representa o número de ciclos e a ordenada representa o sinal de fluorescência (GIBSON; HEID e WILLIAMS, 1996; HEID *et al.*, 1996; GINZINGER, 2002). A figura 18

apresenta um gráfico típico de amplificação obtido durante uma reação de PCR em tempo real usando o sistema TaqMan® de sondas.

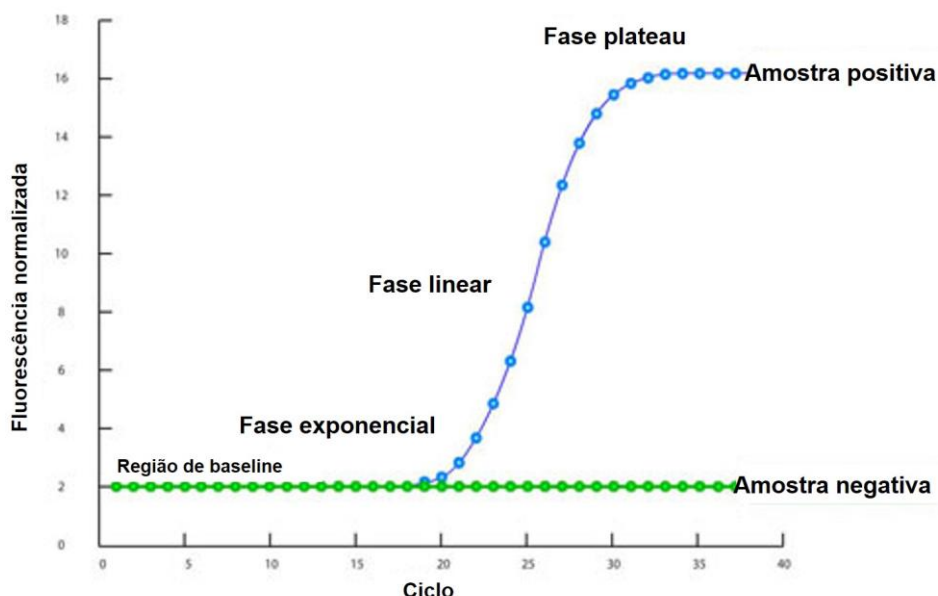


FIGURA 18- EXEMPLO DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDO NA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.

FONTE: Adaptado de <http://www.abbottmolecular.com/technologies/real-time-pcr/maxratio-data-analysis.html>

O sinal detectado pelo sistema óptico é analisado pelo software e expresso graficamente, o que permite o monitoramento em tempo real da cinética e da eficiência da reação de amplificação (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

O sistema de PCR em tempo real permite a amplificação, a detecção e a quantificação de DNA em uma única etapa, o que diminui os riscos de contaminação durante a reação e propicia resultados mais rápidos, eliminando assim, as etapas seguintes à PCR como gel de agarose para a visualização da amplificação e o gel de acrilamida para a genotipagem das amostras, no caso de PCR-RFLP.

Os reagentes empregados no processo são os mesmos utilizados numa PCR convencional com a adição de fluorocromos (moléculas que absorvem e emitem luz em comprimento de onda específico), presentes em sondas de hibridização específicas. Na presença de produto amplificado, os fluorocromos, excitados por uma fonte de luz (laser), emitem um sinal proporcional à quantidade de produto sintetizado, que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de sequências-alvo presentes na reação de amplificação (SAUNDERS, 2004).

O equipamento utiliza uma luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação. A fluorescência produzida pela amostra é detectada pelo sistema e o

momento da reação de PCR (ciclo) em que a fluorescência de determinada amostra torna-se significativamente maior do que o ruído de fundo ou fluorescência de base (*background*) é denominado Ct (*threshold cycle*; ciclo limite) (GIBSON; HEID e WILLIAMS, 1996).

Na tabela 8 estão os genes em estudo com a técnica de PCR em tempo real, bem como as características dos polimorfismos estudados.

TABELA 8- GENES EM ESTUDO COM A TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL (qPCR).

Gene	Cromossomo e localização	Polimorfismos			
ADRA2	10q24-q26	rs10885122	G>T	Intergênica	Transversão
KCNQ1	11p15.5	rs2237892	C>T	OMIM #607542 Intron 15	Transição
PPAR γ	3p25	rs1801282	C>G	OMIM #601487 Pro12Ala CCA> GCA Missense	Transversão
SLC2A2	3q26.1-q26.2	rs5393	T>G	OMIM #138160	Transversão
ABCC8	11p15.1	rs3758947	C>T	OMIM #600509	Transição

3.14 Produtos de glicação avançada (AGEs)

A hiperglicemia aumenta simultaneamente o estresse oxidativo e o processo de glicação. Este aumento da glicação e da oxidação química pode contribuir de maneira sinérgica para a formação de AGEs e para o desenvolvimento das complicações diabéticas (THORPE e BAYNES, 1996).

O conceito de AGEs foi proposto pelo químico francês L.C. Maillard, um século atrás (BROWNLEE; CERAMI e VLASSARA, 1988). Ele identificou que produtos de fluorescência marrom eram obtidos quando aminoácidos eram aquecidos com açúcares redutores (VLASSARA e PALACE, 2002; TAKEUCHI e YAMAGISHI, 2009).

Os produtos de glicação avançada (AGEs) são formados a partir de reações não enzimáticas entre açúcares redutores e grupamentos amino livres de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MAILLARD, 1912; CHEKIR *et al.*, 2006).

As modificações a que estão sujeitas estas moléculas (proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos) são do tipo pós-traducionais, ou seja, várias reações químicas ocorrem após o processo enzimático de maturação proteica e podem ser consideradas marcas do envelhecimento molecular proteico (JAISSON e GILLERY, 2010). Estas reações químicas incluem: oxidação, racemização, isomerização, deamidação, nitratação, carbonilação, carbamilação e a glicação (glico-oxidação). Dentre estas, a reação química mais comum é a glicação.

Proteínas danificadas são um substrato molecular para muitas disfunções descritas em doenças metabólicas e em doenças relacionadas ao envelhecimento. Portanto, os produtos derivados destas modificações pós-traducionais são considerados biomarcadores úteis para estas doenças (BAYNES, 2004; MEERWALDT *et al.*, 2008). Apesar do uso promissor e potencial destes biomarcadores, eles não são dosados frequentemente na prática, exceto a hemoglobina glicada (HbA1C) que é considerada padrão ouro para avaliar o controle glicêmico no *diabetes mellitus* (JAISSON e GILLERY, 2010). A implementação de novas tecnologias como a espectrometria de massas e a proteômica nos laboratórios clínicos pode constituir um passo importante para o uso destes biomarcadores na rotina.

Os AGEs são formados ao longo da vida, se acumulam com o envelhecimento, e na presença de doenças como diabetes, insuficiência renal e Alzheimer tem acúmulo acelerado (SINGH *et al.*, 2001; RAMASAMY *et al.*, 2005). Esses produtos de glicação apresentam funções imunomoduladoras e podem estar envolvidos em diversos processos fisiológicos, normais e anormais (RAMASAMY *et al.*, 2005). As alterações provocadas nas proteínas, em especial, alteram suas propriedades estruturais e biológicas (JAISSON e GILLERY, 2010).

À nível molecular os AGEs promovem estresse oxidativo e disfunção endotelial, além de induzir os fatores de crescimento. Como consequência, são moléculas envolvidas em diversas condições patológicas incluindo envelhecimento, hipertensão, insuficiência renal, diabetes ou retinopatia e nefropatia diabética (ODETTI *et al.*, 1992; BEISSWENGER *et al.*, 1993).

Muitas das complicações a longo prazo ou tardias do diabetes, podem ser associadas ao processo de glicação das proteínas (BUONGIORNO *et al.*, 1997; ANGUIZOLA *et al.*, 2013). Os AGEs são dificilmente degradados e permanecem por longo período de tempo nos tecidos diabéticos mesmo que o paciente apresente um bom controle glicêmico (YAMAGISHI *et al.*, 2012).

O primeiro estágio da reação de glicação envolve o ataque nucleofílico de um açúcar redutor com grupamentos amina primário de proteínas para formar a base de Schiff. Este produto é então submetido a um rearranjo lento para formar um produto mais estável, denominado de produto de Amadori (LAPOLLA; BASSO e TRALDI, 2005; ZHANG *et al.*, 2009). Ao longo de dias ou semanas, estes produtos de Amadori sofrem reações de rearranjo para formar de maneira irreversível os AGEs (YAMAGISHI *et al.*, 2012). Neste período podem ocorrer reações de oxidação, desidratação, ciclização, fragmentação e etapas de reticulação, como por exemplo através da formação de compostos reativos de dicarbonil (SINGH *et al.*, 2001). Estes últimos compostos exibem reatividade significativamente aumentada para determinados sítios como resíduos de arginina e lisina nas proteínas. O resultado final destas reações é a criação de um grupo heterogêneo de componentes complexos denominado de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (LAPOLLA; BASSO e TRALDI, 2005; ANGUIZOLA *et al.*, 2013). A figura 19 apresenta a reação de Maillard com os estágios da reação de glicação.

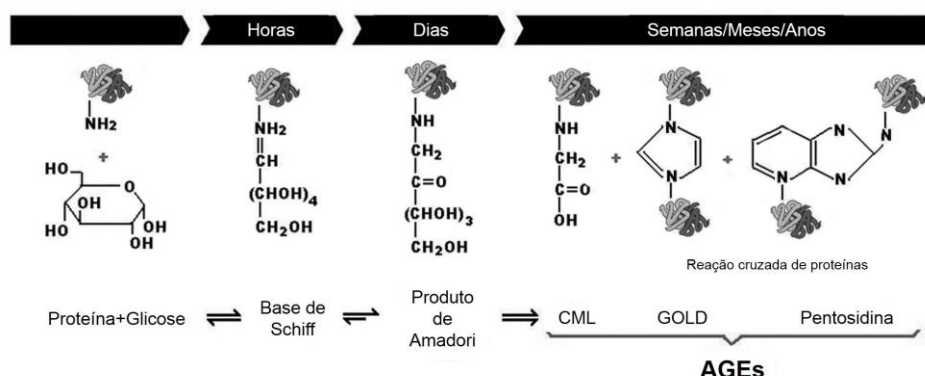


FIGURA 19- ESTÁGIOS DA REAÇÃO DE GLICAÇÃO (REAÇÃO DE MAILLARD).

A figura apresenta os estágios da reação de Maillard. Em um primeiro momento às moléculas de proteínas se ligam moléculas de glucose em um processo reversível que dura horas e resulta na formação de uma base de Schiff. Em dias, esta base de Schiff, após sofrer rearranjos, é convertida à produtos de Amadori caracterizados como produtos mais estáveis. Ao longo de semanas, meses e anos, estes produtos sofrem diversas reações que formarão os produtos de glicação avançada. Estes produtos são obtidos de maneira irreversível e formados por um grupo heterogêneo de moléculas.

CML: carboximetil lisina; GOLD: glioxal derivado dímero de lisina.

FONTE: Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Diversos AGEs têm sido caracterizados, como a pentosidina e o *N* ϵ -carboximetilisina (CML), mas outros ainda estão sendo isolados uma vez que o processo de glicação não acontece apenas com açúcares redutores simples, mas também com vários outros metabólitos derivados do açúcar como o gliceraldeído 3-fosfato ou a frutose 6-fosfato (HAMADA *et al.*, 1996). A figura 20 mostra a estrutura de alguns produtos derivados de modificações pós-traducionais.

Os AGEs tendem a apresentar coloração marrom-amarelada e a habilidade de formar *cross-links* (ligação cruzada) proteína-proteína inter e intramoleculares. São fortemente reativos e continuam a reagir com grupamentos amino vizinhos ao longo do tempo (BUONGIORNO *et al.*, 1997).

Os AGEs podem então ser provenientes de reações endógenas, como descrito acima, e também de fontes exógenas como o fumo e a dieta (CERAMI *et al.*, 1997; KOSCHINSKY *et al.*, 1997; NICHOLL *et al.*, 1998; VLASSARA *et al.*, 2002). O processamento dos alimentos, especialmente através de aquecimento prolongado (pasteurização, esterilização, fritura, grelhados, assados e fervuras), acelera a obtenção de produtos de glico-oxidação e lipo-oxidação, e uma proporção significativa dos AGEs ingeridos é absorvida junto com os alimentos (GOH e COOPER, 2008). Os principais alimentos ricos em AGEs são manteiga, margarina, queijos (especialmente queijo parmesão), carnes, *fast food*, cereais matinais, biscoitos, batatas chips e inclusive fórmulas lácteas infantis. Os níveis de AGEs em fumantes são mais elevados bem como em pacientes com alta ingestão de AGEs (dieta), com aumento concomitante dos marcadores inflamatórios (CERAMI *et al.*, 1997; HAO *et al.*, 2008).

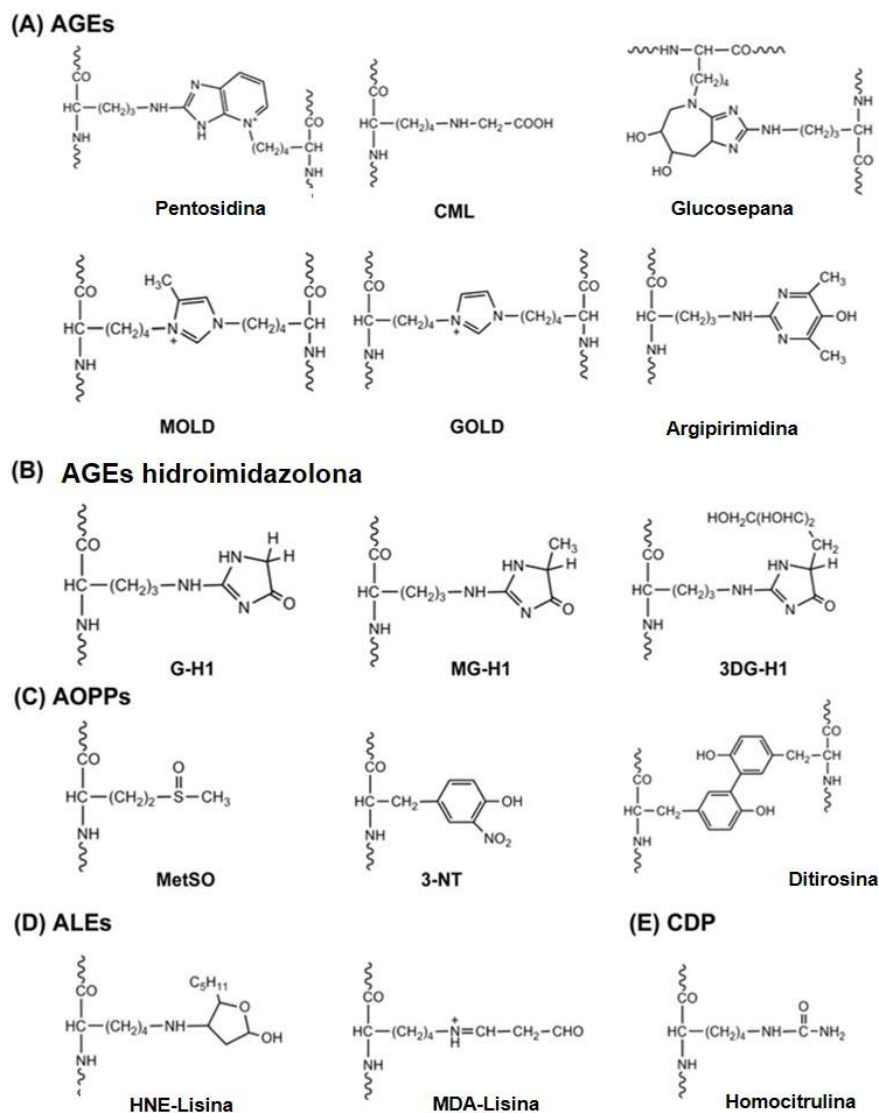


FIGURA 20- ESTRUTURA DOS PRODUTOS DERIVADOS DE MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS.

(A) AGEs derivados da via de glicação envolvendo produtos de Amadori como precursores comuns. CML: carboximetilisina; MOLD: metilglioxal derivado dímero de lisina; GOLD: glioxal derivado dímero de lisina; (B) AGEs derivados hidroimidazolona derivados principalmente da ligação direta a compostos reativos carbonil (RCCs). G-H1: hidroimidazolona derivado glioxal; MG-H1: metilglioxal derivado hidroimidazolona 1; 3DG-H1: 3-deoxiglucosona derivado hidroimidazolona; (C) Produtos de oxidação avançada de proteína (AOPPs). MetSo: sulfóxido de metionina; 3-NT: 3-nitrotirosina; (D) Produtos finais de lipoxidação avançada (ALEs). HNE-Lisina: 4-hidroxinonenal-lisina; MDA-Lisina: malondialdeído-lisina; (E) Produto derivado da carbamilação. Homocitrulina: o mais representativo da classe.

FONTE: Adaptado de (JAISSON e GILLERY, 2010).

O mecanismo de ação dos AGEs pode ser via receptor-dependente ou receptor-independente. Eles podem também atuar intracelularmente ou podem circular e atuar na superfície de receptores celulares como os receptores de AGEs (RAGEs) (GOH e COOPER, 2008). A ativação do RAGE pelos AGEs é a principal causa de complicações vasculares em pacientes diabéticos (MARCOVECCHIO; LUCANTONI e CHIARELLI, 2011), além disso, a ligação AGE-RAGE promove o estresse oxidativo e estimula a liberação de citocinas e fatores de crescimento por diversas células como os macrófagos, células mesangiais e do endotélio vascular. Estes componentes desencadeiam processos inflamatórios e disfunção endotelial, que é a base da fisiopatologia do *diabetes mellitus* (BROWNLEE, 2001; TESSIER, 2010).

O processo de obtenção dos produtos de glicação avançada ocorre de maneira lenta e por um período prolongado, afetando proteínas de vida longa (BUONGIORNO *et al.*, 1997). Os componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo e, em particular, os componentes da membrana basal, tais como colágeno de tipo IV são os principais alvos, mas outras proteínas de longa duração também pode sofrer glicação avançada, incluindo a mielina, tubulina, um ativador de plasminogênio e fibrinogênio (VLASSARA, 1996).

Os AGEs se acumulam dentro de vários órgãos que são alvo das complicações do diabetes, incluindo os rins, a retina e as placas ateroscleróticas (MAKITA *et al.*, 1994; BUCALA e VLASSARA, 1995; HAMMES *et al.*, 1999). O rim é um alvo para o dano mediado pelos AGEs e é também um contribuinte para as concentrações de AGEs circulantes, isto porque o rim é a principal via de eliminação dos AGEs (MIYATA *et al.*, 1998). A CML e outros AGEs foram localizados nos vasos sanguíneos da retina em pacientes com diabetes tipo 2 e foram correlacionados com o grau de retinopatia (MURATA *et al.*, 1997; STITT, 2001). Os AGEs nestes órgãos promovem o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares por desencadear vias bioquímicas específicas (GOLDIN *et al.*, 2006).

Estudos clínicos têm demonstrado que o nível de AGEs circulante pode ser associado a diversas complicações do diabetes (GOH e COOPER, 2008). Não existe ainda uma metodologia universal aceita para a detecção e dosagem dos AGEs, não há uma unidade de medida padrão reconhecida internacionalmente para expressar os níveis de AGEs, o que torna a comparação dos resultados entre os diferentes laboratórios muito difícil.

Na literatura estão descritas diversas estratégias farmacológicas de inibição dos AGEs, que atuam na redução ou inibição da sua formação, como por exemplo a aminoguanidina (BOLTON *et al.*, 2004), piridoxamina (DEGENHARDT *et al.*, 2002); que atuam na quebra dos *cross-links* como brometo de fenilaciltiazólio (PTB) (FIGAROLA *et al.*, 2007) e alagébrio (PEPPA *et al.*, 2006); bloqueadores de RAGE como sRAGE (THALLAS-BONKE *et al.*, 2004); eliminadores de AGEs, como a lisozima (KASS *et al.*, 2001); além da redução à exposição exógena de AGE, com uma dieta pobre em AGEs (LIN *et al.*, 2003).

Agentes hipoglicemiantes empregados no controle do diabetes como a metformina e a pioglitazona diminuem a formação de AGEs por controlar a hiperglicemia, e eles também se mostraram eficazes na prevenção da formação dos AGEs e dos *cross-links in vitro*, de maneira independente aos efeitos da glucose em si (RAHBAR *et al.*, 2000).

Os AGEs induzem de maneira significativa a apoptose de trofoblastos no primeiro trimestre de gestação e reduzem a secreção do hormônio gonadotrofina coriônica (KONISHI *et al.*, 2004). Estes danos mediados pelos AGEs nos trofoblastos, podem provocar prejuízos na implantação do óvulo e disfunção na placenta. Foi descrito na literatura que mulheres com pré-eclâmpsia apresentam níveis mais elevados de AGEs na placenta à termo do que gestantes saudáveis (CHEKIR *et al.*, 2006). Estes dados indicam um envolvimento dos AGEs no estresse oxidativo dos trofoblastos.

Lappas e colaboradores (LAPPAS; PERMEZEL e RICE, 2007) mostraram que os AGEs podem exercer ações pró-inflamatórias em tecidos gestacionais humanos e uma função do eixo AGEs-RAGE no parto prematuro também tem sido sugerida (KONISHI *et al.*, 2004; NAKAMURA *et al.*, 2007).

Concentrações elevadas de AGEs, em gestantes, podem influenciar o delicado mecanismo do balanço materno-fetal tanto nos vasos do cordão umbilical quanto na placenta, além de posteriormente poder alterar o desfecho da gestação (BUONGIORNO *et al.*, 1997).

A gestação induz de maneira significativa um aumento nos níveis da proteína RAGE (receptor dos AGEs) tanto no miométrio como na vasculatura omental (COOKE *et al.*, 2003). O RAGE tem sido associado também à pré-eclâmpsia e a infecção intra-amniótica (BUHIMSCHI *et al.*, 2007).

Estudos na literatura descrevem níveis elevados de AGEs em gestantes com DMG quando comparadas à gestantes saudáveis (BUONGIORNO *et al.*, 1997; HARSEM *et al.*, 2008; GUOSHENG *et al.*, 2009).

3.14.1 CML (carboximetilisina)

A molécula de CML é o principal AGE não fluorescente encontrado *in vivo* (BAYNES e THORPE, 1999) e melhor caracterizado, além de apresentar a maior concentração sérica em humanos. A molécula é derivada de resíduos de lisina.

A CML pode ser detectada por metodologias como ELISA (GOH e COOPER, 2008) e por espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida, mais recentemente.

Estudos *in vitro* mostraram que espécies reativas de oxigênio (ROS) levam à formação estável e irreversível de moléculas de CML (AHMED; THORPE e BAYNES, 1986; SMITH e THORNALLEY, 1992). Ao longo do envelhecimento, estas moléculas acumulam na pele e nas lentes oculares, e indivíduos diabéticos apresentam níveis mais elevados de formação de CML (DUNN *et al.*, 1991).

Sabe-se que não apenas a glucose mas também o ascorbato, as pentoses e outros carboídratos, podem formar a CML e a pentosidina (DYER *et al.*, 1991; GRANDHEE e MONNIER, 1991). A CML pode ser formada a partir de produtos da peroxidação lipídica, de maneira independente às reações de glico-oxidação.

Está descrito na literatura que a CML e os AGEs derivados do metilglioxal atuam como aceleradores da doença cardiovascular (ABORDO e THORNALLEY, 1997; KISLINGER *et al.*, 1999) e que em pacientes com função renal prejudicada, os níveis de CML estão aumentados (WAGNER *et al.*, 2001).

Aumento nos níveis de CML e pentosidina, quando ajustados pela idade, foram correlacionados com a severidade da nefropatia e retinopatia no diabetes, o que sugere que as reações de glicação e o estresse oxidativo podem ser mecanismos importantes na patogênese das complicações do diabetes (SELL *et al.*, 1992; BEISSWENGER *et al.*, 1993; DYER *et al.*, 1993).

3.14.2 MG-H1 (metilglioxal derivado hidroimidazolona 1)

Além da via de formação dos AGEs envolvendo os produtos de Amadori, vários AGEs são formados independentemente por ligação direta a compostos reativos carbonil (RCCs), incluindo glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglucosona (3DG), preferencialmente nos resíduos arginina das proteínas, gerando hidroimidazolonas como subprodutos (AHMED e THORNALLEY, 2007).

Metilglioxal é caracterizado como precursor dos AGEs e é um metabólito reativo α -oxaloaldeído. Metilglioxal reage reversivelmente com resíduos de cisteína para formar adutos hemitioacetal, e com resíduos de lisina e arginina para formar resíduos de glicosilamina (LO *et al.*, 1994). Reações subsequentes com resíduos de lisina ocorrem de forma irreversível para formar N_ϵ -(1-carboxietil)lisina (CEL) (AHMED *et al.*, 1997) e 1,3-di(N_ϵ -lisino)-4-metil-imidazólio (MOLD). Uma reação irreversível do metilglioxal com resíduos de arginina forma N_δ -(4-carboxi-4,6-dimetil-5,6-dihidroxi-1,4,5,6-tetra-hidropirimidina-2-il)ornitina (THP) e argipirimidina. Entretanto, o maior aduto de proteínas modificadas minimamente, como encontrado *in vivo*, é o metilglioxal derivado hidroimidazolona (MG-H). Três isômeros estruturas são formados: N_δ -(5-hidro-5-metil-4-imidazolona-2-il)-ornitina (MG-H1), 2-amino-5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazolona-1-il)ácido pentanóico (MG-H2) e 2-amino-5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazolona-1-il)ácido pentanóico (MG-H3). MG-H3 é uma isoforma instável e não é usualmente quantificada. A figura 21 apresenta a estrutura química dos isômeros formados a partir dos AGEs derivados de arginina.

A $\frac{1}{2}$ vida do MG-H1 e MG-H2 é de 1 a 2 semanas em condições fisiológicas (AHMED *et al.*, 2003), uma meia vida relativamente curta.

Foi mais recentemente que o metilglioxal ganhou maior atenção no meio científico pois tem sido caracterizado como o precursor mais importante da rápida produção intracelular de AGEs (BROWNLEE, 2001; BROUWERS *et al.*, 2011).

AGEs derivados de resíduos arginina

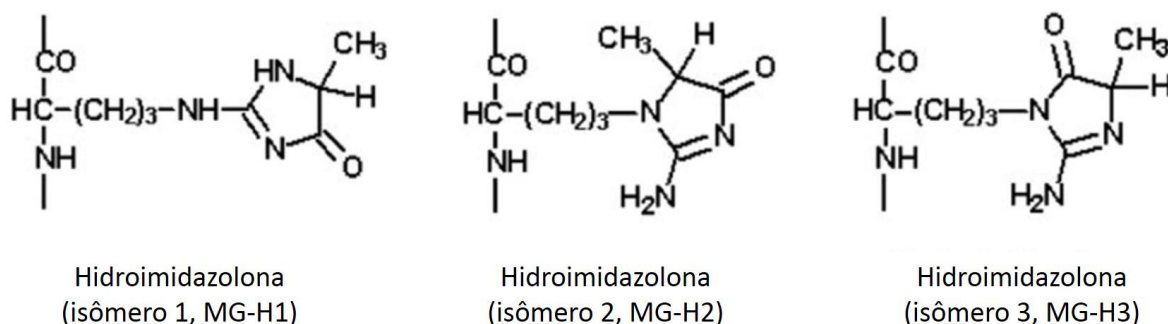


FIGURA 21- AGEs DERIVADOS DE RESÍDUOS DE ARGININA.

FONTE: AHMED *et al.*, 2003.

3.14.3 Pentosidina

Em 1989 a pentosidina foi isolada e caracterizada por Sell e Monnier, através da fluorescência emitida em amostras de colágeno humano e em outras proteínas do tecido (DYER *et al.*, 1991). A pentosidina apresenta fluorescência intrínseca, assim a fluorescência tissular e plasmática podem ser utilizadas como marcadores da acumulação de AGEs (GOH e COOPER, 2008). Com o envelhecimento a pentosidina se acumula nos tecidos ricos em colágeno e, em pacientes com complicações renais decorrentes do diabetes, se acumula de maneira acelerada (SELL e MONNIER, 1990).

Em uma variedade de tecidos humanos foi detectada a presença da pentosidina. A molécula está presente na pele, na cartilagem da traqueia, no osso cortical, na aorta, no músculo cardíaco, no pulmão, no fígado, nas lentes oculares, nas células vermelhas e nas proteínas plasmáticas (SELL *et al.*, 1991).

Em indivíduos diabéticos, a pentosidina se acumula de maneira acelerada na pele e nas lentes oculares (MCCANCE *et al.*, 1993).

A formação da pentosidina está relacionada ao processo de glicação e também ao processo oxidativo (BAYNES, 1991). A dosagem da pentosidina em amostras fisiológicas é utilizada como marcador sensível do diagnóstico precoce de insuficiência renal (NAKANO *et al.*, 2013). O método mais utilizado atualmente para sua dosagem é o ensaio imunoenzimático rápido (ELISA) visto que a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) requer múltiplas etapas de preparação antes da análise (NAKANO *et al.*, 2013).

A pentosidina está associada de maneira positiva com as complicações microvasculares do diabetes tipo 2; e apresenta-se mais elevada na retinopatia diabética quando comparada à nefropatia diabética. Desta forma, a pentosidina é considerada um fator de risco independente para a retinopatia, hipertensão e hiperlipidemia (KERKENI *et al.*, 2013).

3.15 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Para o desenvolvimento de métodos analíticos convenientes para a dosagem dos AGEs, algumas dificuldades têm sido observadas. A primeira delas diz respeito à variabilidade de estruturas e à meia-vida destes compostos. Alguns deles são produtos fluorescentes estáveis (AGEs), facilmente detectáveis, enquanto outros são instáveis e altamente reativos (RCCs). E a segunda delas diz respeito à ausência de métodos sensíveis e específicos adequados para a detecção dos produtos, visto sua baixa concentração basal (JAISSON e GILLERY, 2010).

Muitas técnicas incluindo, ensaios colorimétricos, medidas de fluorescência, métodos imunológicos e cromatografia gasosa ou líquida acoplada ou não à espectrometria de massas estão descritas na literatura (BUONGIORNO *et al.*, 1997; HARSEM *et al.*, 2008). Estes métodos tornam possível a detecção dos AGEs finais bem como dos produtos intermediários, reativos metabólicos ou de proteínas específicas modificadas.

A espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida foi a metodologia de escolha para a dosagem dos AGEs em gestantes saudáveis e com diabetes gestacional, neste trabalho, por ser uma metodologia de alta sensibilidade e especificidade, além de ser a técnica atual de escolha para a identificação de proteínas e para o estudo de produtos de modificações pós-traducionais, em diferentes condições fisiológicas (JAISSON e GILLERY, 2010).

Métodos de LC-MS/MS têm sido desenvolvidos para o *screening* quantitativo de vários AGEs incluindo pentosidina, CML, *N*_ε-carboxietilisina (CEL), hidroimidazonas, AGEs monosil e AGEs bis(lisil)imidazonium (THORNALLEY *et al.*, 2003).

A espectrometria de massas por definição é uma técnica que permite a identificação da composição química e estrutural de um ou mais compostos químicos em misturas complexas. A identificação ocorre através da determinação da

massa molecular dos compostos na sua forma iônica (com carga), levando em consideração a movimentação da molécula em um campo elétrico ou magnético.

Para que a detecção ocorra, é necessário que o equipamento tenha os componentes adequados para cada etapa da análise. O espectro de massa é composto por uma fonte de íons, um analisador de massa e um detector. É na fonte de íons que os constituintes da amostra são vaporizados e seguem diretamente em direção ao analisador de massa. É no analisador que a separação e análise de cada composto é realizada, ou seja, ocorre a separação de íons através da sua relação massa/carga (m/z): massa do íon/carga do íon. Existem diversos tipos de espectrômetros de massa, o que os diferencia é principalmente o tipo e a natureza do analisador e detector de massa. Após a separação dos íons, estes são recebidos pelo detector, que transforma estes íons em sinais elétricos, os quais serão processados, armazenados e apresentados no software do equipamento.

Existem diversas técnicas de ionização que podem ser empregadas na espectrometria de massas. Dentre elas destacam-se as técnicas de ionização por spray de elétrons (*electrospray*, ESI), a dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e a foto-ionização (APPI: *atmospheric pressure laser ionization*).

O sistema empregado nas análises foi do tipo *electrospray*, método adequado para a análise de proteínas. Nesta técnica um solvente volátil contendo os analitos é bombeado através de um fino capilar de aço inoxidável. Um forte campo elétrico é aplicado à ponta deste capilar e a amostra que sai pelo capilar estará dispersa em um aerosol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas (YAMASHITA e FENN, 1984). Quando o solvente (gás inerte, geralmente nitrogênio) evapora durante o “spray”, formam-se íons moleculares de simples ou múltiplas cargas. Neste momento o fluxo de gás está a uma temperatura elevada (150-200°C) e por isso é eficaz no auxílio à evaporação do excesso de solvente e na formação do aerosol. A figura 22 apresenta o mecanismo de formação do íon na técnica de *electrospray*. São formados íons (+) ou (-) de acordo com o campo elétrico aplicado (FENN *et al.*, 1989, 1990; HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A partir deste momento os íons estarão prontos para entrar no espectrômetro.

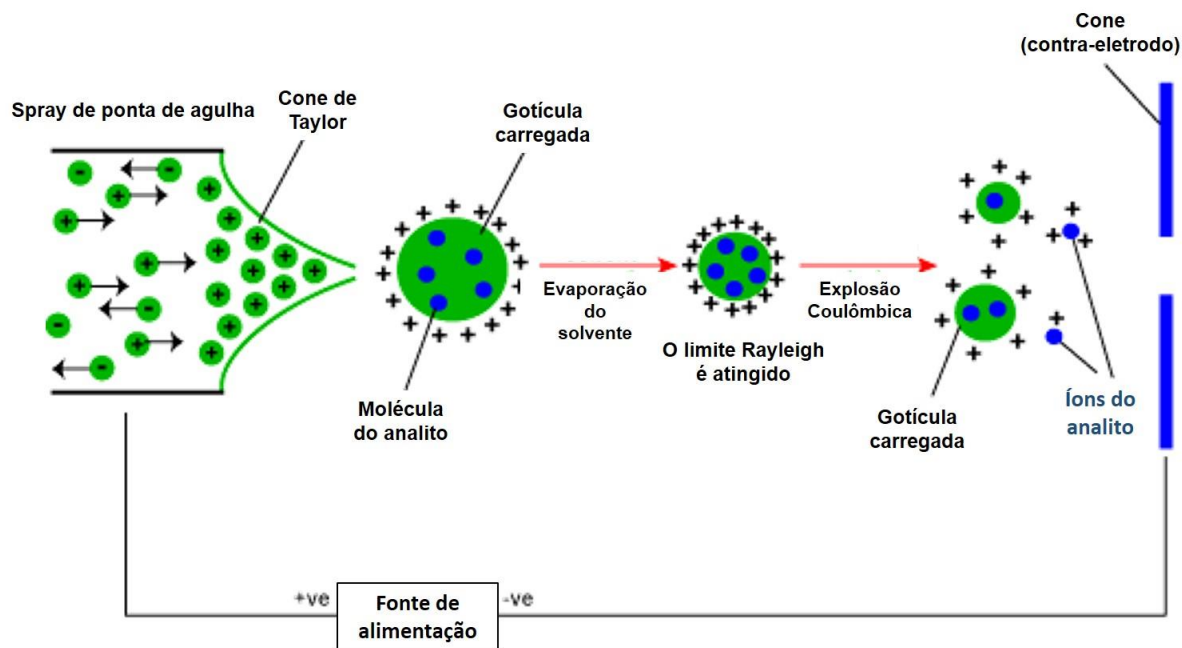


FIGURA 22- MECANISMO DE FORMAÇÃO DE ÍONS NA IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*.

A solução de analito passa através da agulha de eletro pulverização que tem uma diferença de potencial elevado. As gotículas carregadas são então pulverizadas com uma carga de superfície de mesma polaridade que a carga sobre a agulha. As gotículas são repelidas da agulha em direção ao cone Taylor. À medida que as gotículas atravessam, ocorre a evaporação do solvente até que a tensão de superfície não possa sustentar a carga (Limite de Rayleigh). Neste momento ocorre a explosão de Coulomb e são produzidas gotículas carregadas menores que podem repetir o processo ou íons do analito.

FONTE: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html>

A base da espectrometria de massas é a separação destes íons através das suas diferenças de m/z . Uma vez que os íons foram obtidos, é necessário agora separá-los de acordo com suas massas (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Os analisadores de massas são responsáveis por controlar o fluxo dos íons no espectrômetro que ocorre através de campos magnéticos e elétricos. Da mesma maneira que existem diversas fontes de ionização, existem diversos analisadores de massas. O analisador de massas empregado nas análises foi do tipo triplo quadrupolo (Q- *quadrupole*). A figura 23 apresenta um diagrama esquemático de um detector de massas triplo quadrupolo.

O analisador do tipo quadrupolo utiliza a estabilidade das trajetórias em campos elétricos oscilantes, gerados por barras metálicas eletrificadas, para separar os íons de acordo com sua relação m/z (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). O quadrupolo funciona como um filtro, ele estabiliza ou desestabiliza a trajetória dos

íons através do campo elétrico oscilante. Desta forma, os íons de diferentes relações m/z chegam em tempos diferentes ao detector e assim podem ser diferenciados (DASS, 2007). Este sistema é constituído por 4 pólos de sinais opostos que alternam sinais de radiofrequência entre pares, permitindo que apenas um íon atinja o detector a cada vez.

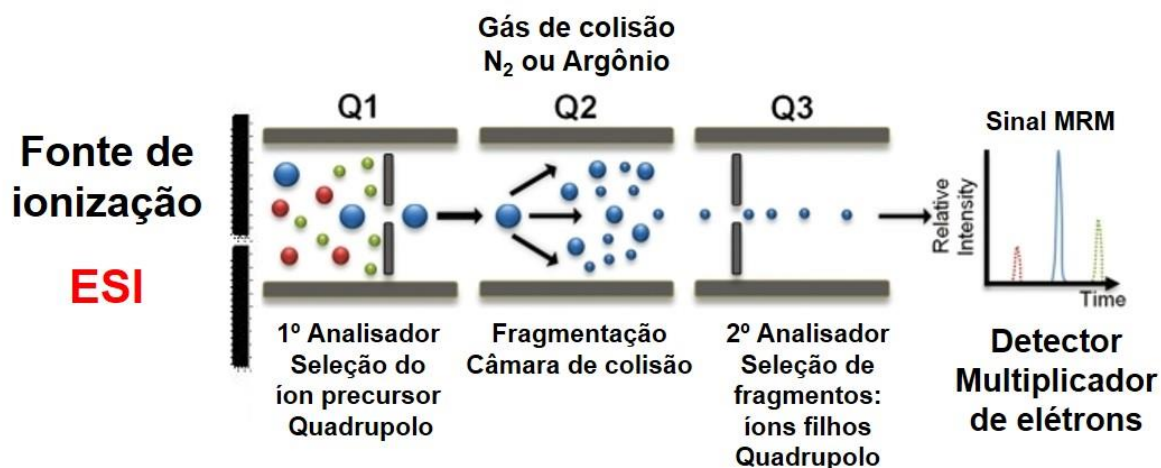


FIGURA 23- DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM DETECTOR DE MASSAS TRIPLO QUADRUPOLO.

O analisador do tipo triplo quadrupolo, apresenta três quadrupolos dispostos sequencialmente. O Q1 e o Q3 atuam como selecionadores de massa e o Q2 atua como câmara de colisão onde ocorre a fragmentação dos íons selecionados pelo primeiro quadrupolo por colisão com um gás inerte, que também direciona os íons produzidos para o Q3. O Q3 por sua vez detecta a fragmentação dos íons e o detector amplifica o sinal.

FONTE: Adaptado de <http://www.cnpsa.embrapa.br/met/images/arquivos>

O sistema de detecção utilizado nas análises foi do tipo multiplicador de elétrons (EM- *Electron Multiplier*). Quando os íons chegam ao detector, eles são detectados e o sinal é amplificado. Os íons colidem com o detector e é produzido um pulso de elétrons. Este pulso de elétrons é coletado e convertido em um sinal digital que fornece uma contagem de íons em função da sua massa. Os detectores convertem os feixes de íons em sinais elétricos que posteriormente são armazenados e convertidos em imagens. Os dados adquiridos são transmitidos ao computador, onde podem ser exibidos como: espectros completo de massas; intensidade de um único ou múltiplos íons em função do tempo; corrente total de íons em função do tempo (DASS, 2007; HOFFMANN e STROOBANT, 2007).

A fim de analisar misturas complexas, uma técnica de separação de componentes (cromatografia gasosa, cromatografia líquida, eletroforese capilar) é

acoplada à espectrometria de massas. A cromatografia líquida provê a separação, em fase líquida dos compostos da mistura a fim de que identificação ou determinação quantitativa destes compostos aconteça. Entretanto, esta técnica dificilmente identifica os compostos de maneira individual; enquanto a espectrometria de massas opera em fase gasosa, sob vácuo, auxiliando na detecção molecular e individual dos compostos (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). A técnicas de LC/MS-MS fornece tanto dados qualitativos como quantitativos, utilizando quantidades pequenas de amostra, além de fornecer um espectro para a identificação do produto isolado.

Quando há o acoplamento de um sistema de cromatografia gasosa (GC) ou líquida (LC) a um espectrômetro de massa, diz-se que a análise é do tipo *on-line*. Ou seja, a amostra passa por um processo de separação antes de chegar na fonte de ionização. Na cromatografia líquida a amostra é introduzida na coluna de separação dissolvida em um líquido (solvente). A fase móvel é composta por misturas de solventes orgânicos ou solventes orgânicos e água (ARDREY, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Detalhamento das atividades a serem desenvolvidas

Duração da pesquisa

A pesquisa teve duração de 48 meses, contados a partir do início do Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.

Comitê de Ética

O projeto teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 927.052.10.05 e CAAE: 1924.0.000.091-10, e da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o Registro n.62/2010 para a utilização das amostras de gestantes com diabetes gestacional e de gestantes saudáveis, respectivamente.

4.2 Amostra

Foram coletadas 814 amostras de sangue periférico de gestantes. Destas, 308 amostras são de pacientes com diagnóstico de diabetes gestacional (DMG) e 506 amostras são de gestantes saudáveis, utilizadas como grupo controle. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) coordenado pelas Doutoradas Rosângela R. Réa e Ana Cristina Ravazzani. As gestantes que aderiram ao estudo, o fizeram através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo 3). O anexo 4 apresenta a planilha utilizada na coleta de dados antropométricos, clínicos e laboratoriais. As amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba.

4.2.1 Critérios para a caracterização da amostra

A amostra em estudo foi subdividida em dois grupos designados como: grupo controle e grupo de *diabetes mellitus* gestacional (DMG). Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos estão descritos abaixo e estão de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil (2001), Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006) e da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009).

- Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): Gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 92mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glucose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas da ingestão da glucose.
- Grupo Controle para Diabetes Gestacional: Gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL.

As amostras de sangue e soro das pacientes foram coletadas, durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento à gestante, não sendo necessária coleta específica para o projeto em tela.

Pacientes que apresentaram edema, proteinúria e hipertensão (EPH-Gestosis) e doença cardiovascular não foram incluídas na amostra (critérios de exclusão).

Os novos critérios para o diagnóstico do diabetes gestacional, alterados no ano de 2011, pela Associação Americana de Diabetes (ADA), estão em fase de implantação no Hospital de Clínicas desta Universidade. Portanto, os critérios empregados neste projeto, até o final da coleta das amostras, são aqueles preconizados pela ADA até o final do ano de 2010.

Os critérios adotados para caracterizar hipertensão, tabagismo, uso de insulina e macrosomia no recém-nato estão descritos a seguir. Os critérios adotados para a hipertensão são da V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2009; pressão sistólica < 130mmHg e diastólica < 80mmHg ou uso de agentes hipertensivos. Foram utilizados os critérios, já estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2009), para definição

de fumante. Fumante equivale àquele que fumou mais de 100 cigarros na vida e fuma atualmente; ex-fumante quem fumou mais de 100 cigarros na vida e deixou de fumar há pelo menos um dia e não fumantes são os que nunca fumaram, os que só experimentaram, os que fumaram menos de 100 cigarros na vida e os ex-fumantes (WHO, 2009). Pacientes em uso de insulina foram àquelas em que o controle da dieta não foi suficiente para reduzir os níveis glicêmicos, a glicemia de jejum permaneceu superior a 95 mg/dL e a pós prandial superior a 130 mg/dL (SBD, 2009). Os recém-natos macrossômicos foram àqueles que ao nascer apresentaram peso superior a 4,00kg (ZHANG *et al.*, 2008).

4.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico, das amostras de sangue periférico, foi extraído a partir de leucócitos pelo método de *salting out* (LAHIRI e NURNBERGER, J. I., 1991), com modificações, ou com o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art 28-9042-65). As modificações empregadas no método de *salting out* encontram-se em anexo (Anexo 5).

4.4 Quantificação do DNA

Após extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Witter e Kusakawa (WITTWER e KUSUKAWA, 2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra- pura estéril e quantificadas por espectrofotometria em 260 nm (Bio Photometer, Eppendorf ou Nanodrop, Thermo Scientific).

Concentração em ng/μL de DNA (fita dupla) = $A_{260} \times 50 \times \text{diluição}$

As amostras com concentração de DNA superiores a 100 ng/μL foram consideradas adequadas.

A pureza da amostra do DNA é estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,8 e 2,0 são considerados adequados (SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS, 1989).

Amostras que não apresentaram resultados satisfatórios, com a relação A_{260}/A_{280} , sendo inferior a 1,8 ou superior a 2,0, e concentrações de DNA abaixo de 100 ng/ μ L, foram submetidas a uma nova extração.

Todas as amostras de DNA foram normalizadas para a concentração de 100 ng/ μ L (para a realização dos ensaios de PCR e PCR-RFLP) e 20 ng/ μ L (para análises de PCR em tempo real) por diluição com água- ultrapura estéril e mantidas em freezer a - 20°C até o momento da análise.

4.5 Reação de PCR para o polimorfismo A3243G do mtDNA

Para a identificação do polimorfismo A3243G (a partir do DNA total genômico), foram estabelecidas as condições para a amplificação de um fragmento do mtDNA contendo 293 pares de bases, empregando oligonucleotídeos iniciadores descritos por Chen e colaboradores (CHEN *et al.*, 2000). A tabela 9 apresenta as condições estabelecidas para a produção deste amplicon.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Eppendorf Gradient (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados em relação à quantidade e qualidade por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetil-aminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2 μ L do produto de PCR acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL) e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens foram capturadas e foto-documentadas com câmara CCD (Sistema Biochemi, UVP).

TABELA 9- CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA A REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO POLIMORFISMO A3243G DO mtDNA.

Reagentes	Região Promotora	
Oligonucleotídeos iniciadores	mtDNA 1 F: 5'- AGG ACA AGA GAA ATA AGG CC-3' mtDNA 1 R: 5'- TAC GCA AAG GCC CCA ACG T-3'	
	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	10pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	100ng/20µL	1,0µL
Tampão Taq 10X*	1X	2,0µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6µL
Água reagente estéril	----	13,4µL
Taq DNA polimerase (5U/µL) (Taq <i>Platinum</i>)	1U	0,2µL
Ciclos térmicos	1 ciclo 95°C → 3min 32 ciclos: 95°C → 30seg. 60°C → 30 seg. 72°C → 1 min 1 ciclo: 72°C → 10min	

*Tampão Taq 10X com (NH₄)₂SO₄: 750mM Tris-HCl (pH 8,8- 25°C); 200mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) Tween 20.

4.6 Detecção molecular do polimorfismo A3243G do mtDNA por PCR-RFLP

Os fragmentos de DNA oriundos das reações de PCR-RFLP foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1 ou 19:1) em cuba miniProtean 3, BioRad (100x75x0,75mm). Na tabela 10 está descrito o preparo do gel empregado na reação e as condições de ensaio.

TABELA 10- PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA E CONDIÇÕES UTILIZADAS NOS ENSAIOS DE PCR-RFLP PARA O POLIMORFISMO A3243G DO mtDNA.

	Gene mtDNA
Reagentes	Gel a 10%
Solução a 40% Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 (GE, HealthCare)	1,66mL
TBE 5X	1,0mL
Água ultrapura	qsp 5mL (2,34mL)
Persulfato de amônio (APS) 10% p/v	0,040mL
TEMED*	0,005mL
Condições de ensaio	
<i>Pré-corrída</i>	30 min, 150V
<i>Tampão de corrida</i>	TBE 1,0X
<i>Corrente</i>	150V (28mA/gel)
<i>Temperatura</i>	Geladeira (4-8°C)
<i>Tempo</i>	~2h00min

Géis (5mL) para a cuba miniProtean 3, BioRad (100 x 75 x 0,75mm).

*TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

O polimorfismo A3243G do mtDNA foi analisado por PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *Apal* (New England BioLabs). Na tabela 11 está descrito o protocolo utilizado para a PCR-RFLP do mtDNA.

TABELA 11- PROTOCOLO PARA A DETECÇÃO DO POLIMORFISMO A3243G DO mtDNA POR PCR-RFLP.

	Polimorfismo
Reagentes	A3243G
Produto de PCR (~20ng/μL)	1,25μL
Tampão (10X concentrado)	0,5μL (1X)*
Água ultrapura estéril	3,13μL
Enzima de restrição (10U/μL) <i>Apal</i> (5'...GGGCC ^C ...3')	0,125μL (1,25U)
Volume final de reação	5,0μL
Temperatura de incubação	37°C
Tempo de incubação	16h

*Tampão 1X NEBuffer 4 (Fermentas): 50mM acetato de potássio, 20mM Tris acetato, 10mM de acetato de magnésio, 1mM ditiotreitol (pH 7,9 25°C).

4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em Tempo Real (TaqMan®)

O DNA depois de extraído e a concentração normalizada para 20ng/μL foi utilizado para a técnica de PCR em tempo real.

Os primers e sondas empregados nas análises foram sintetizados pela *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA).

O equipamento empregado nestas análises foi o termociclador StepOnePlus™ (*Applied Biosystems*) do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFPR.

O preparo da placa de PCR em tempo real foi feito em fluxo laminar a fim de proteger os reagentes de contaminação. Em cada placa foram adicionados dois controles negativos (*NTC: no template control*) os quais continham apenas o mix de reação (sem DNA), e um controle positivo para cada uma das variantes estudadas.

Na tabela 12 estão descritos os protocolos otimizados para a PCR tempo real e as condições de termo ciclagem empregadas.

TABELA 12- CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.

Reagentes	Volume para reação de 6μL
SNP genotyping assay mix (20x)	0,3μL
Master Mix (2x) *	3,0μL
Água ultrapura estéril	1,7μL
DNA (20ng/μL)	1,0μL
Ciclos térmicos para os genes ADRA2, ABCC8	1 ciclo Pré-PCR → 60°C 30seg. 1 ciclo 95°C → 10min. 40 ciclos: 95°C → 15seg. 60°C → 1 min. 1 ciclo Pós-PCR → 60°C 30seg.
Ciclos térmicos para os genes KCNQ1, PPARG, SLC2A2	1 ciclo Pré-PCR → 60°C 30seg. 1 ciclo 95°C → 10min. 50 ciclos: 92 °C → 15seg. 60°C → 1 min. 1 ciclo Pós-PCR → 60°C 30seg.

* DNA polimerase AmpliTaq Gold® ultra pura; desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), Referência passiva ROX™ e componentes de tampão otimizados.

Os genótipos foram obtidos com mais de 95% de qualidade (*quality threshold*), dado fornecido pelo software de análise dos dados (Applied Biosystems StepOnePlus™ Instrument).

A tabela 13 apresenta os dados de identificação dos ensaios de PCR em tempo real empregados nas análises.

TABELA 13- IDENTIFICAÇÃO DOS ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL EMPREGADOS NAS ANÁLISES.

Gene	Identificação do ensaio (<i>Applied Biosystems</i>)
<i>ADRA2A</i>	C_175459_10
<i>KCNQ1</i>	C_16171025_10
<i>PPARγ</i>	C_1129864_10
<i>SLC2A2</i>	C_11676794_10
<i>ABCC8</i>	C_2991268_50

FONTE: <https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html>

4.8 Quantificação das biomoléculas e dos parâmetros bioquímicos

As biomoléculas associadas ao diabetes, estresse oxidativo e metabolismo mitocondrial foram quantificadas a fim de buscar por marcadores de risco/proteção e/ou associação com diabetes gestacional. As biomoléculas analisadas foram separadas por grupos como descrito abaixo.

Biomoléculas (rotina): Glicemia de jejum, perfil lipídico, ureia, creatinina, proteína total, albumina, ácido úrico. Estas foram quantificadas no laboratório de Bioquímica-HC-UFPR no equipamento Architect (*Abbott*) utilizando reagentes comerciais, controles e calibradores recomendados pelos respectivos fabricantes dos reagentes.

Biomoléculas associadas a complicações no DMG: HbA1C (hemoglobina glicada) marcador do controle glicêmico, quantificada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR.

A quantificação do 1,5-anidroglicitol (marcador de hiperglicemia pós-prandial) foi realizada no laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR com metodologia desenvolvida pela MsC Kátia Boritza do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Biomoléculas associadas ao estresse oxidativo: os produtos de glicação avançada (AGEs) foram quantificados por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida (etapa desenvolvida no Laboratório de Biologia e de Pesquisa Pediátrica da Universidade de Reims, Champagne-Ardenne, França) sob a orientação do professor Dr. Philippe Gillery e do Dr. Stéphane Jaisson.

As quantificações em soro dos analitos em estudo foram realizadas em sistema automatizado Architect Ci8200 (*Abbott*), com calibradores e controles Trulab. Os princípios dos métodos e reagentes utilizados estão descritos na Tabela 14.

Os índices de risco para doença cardiovascular, razão colesterol total/HDL-C, razão LDL-C/HDL-C e $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ também foram calculados e avaliados (DOBIASOVA *et al.*, 1998).

TABELA 14- PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.

Dosagem	Princípio metodológico	Reagente utilizado	Valores de referência
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico (TBHB).	<i>Abbott</i> Laboratórios do Brasil Ltda.	2,6-6,0 mg/dL
Albumina	Reação com verde de bromocresol		3,5-5,0 g/dL
Colesterol total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)		< 200 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	<i>Biosys</i> Ltda.	0,6-1,1 mg/dL
HDL - colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	<i>Labtest</i> Diagnóstica S/A.	Alto > 60 mg/dL Baixo <40 mg/dL
LDL - colesterol*	Calculado pela equação de Friedewald	IV Diretrizes Brasileiras	<130 mg/dL
Colesterol não – HDL	Cálculo: Colesterol – HDL-C		-
Glucose	Hexoquinase	<i>Abbott</i> Laboratórios do Brasil Ltda.	60-99 mg/dL
HbA1C	HPLC troca iônica	<i>Variant</i> (<i>BioRad</i>)	<6,5%
1,5AG	Método enzimático (Glycomark, Tomen America Inc, USA)	<i>GlycoMark</i>	>10 µg/mL
AIP (Log(TG/HDL-C))	Cálculo: Log(TG/HDL-C)		<0,11 Baixo risco 0,11-0,21 Risco médio >0,21 Alto risco **
Proteínas Totais	Reação do Biureto	<i>Abbott</i> Laboratórios do Brasil Ltda	6,0-8,0 g/dL
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol quinase, glicerol-3-fostato oxidase e peroxidase com reação de Trinder.		< 150 mg/dL
Ureia	Ensaio cinético com urease, glutamato desidrogenase (GLD), nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH).	<i>Abbott</i> Laboratórios do Brasil Ltda.	15-45 mg/dL

*Equação de Friedewald, LDL-Colesterol = Colesterol total – HDL-Colesterol – Triglicérides/5

**Calculador do índice aterogênico, disponível em <http://www.biomed.cas.cz/fgu/aip/>

4.9 Quantificação dos produtos de glicação avançada (AGEs) por espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

As biomoléculas pentosidina, N^ε-carboximetilisina (CML) e metilglioxal-derivado hidroimidazolona-1 (MG-H1) foram dosadas no soro. A fração total foi dosada, o que inclui as biomoléculas livres e as ligadas às proteínas.

As análises foram realizadas no espectrômetro de massas modelo API4000 tipo triplo quadrupolo (ABSciex, Les Ulis, França), conectado a uma fonte de ionização ortogonal (90°) por *electrospray* (TurbolonSpray®). O sistema de cromatografia líquida foi composto de um amostrador automático (LC20-AB), uma bomba quaternária (LC20-AC) e de um forno (LC20-AC) (Shimadzu UHPLC LC20, Champs-Sur-Marne, França).

O protocolo de preparação das amostras para a dosagem das biomoléculas está descrito na Tabela 15.

TABELA 15- PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A HIDRÓLISE ÁCIDA.

	Pentosidina	CML+MG-H1
Soro	25 µL	35 µL
Padrão Interno (PI)	10 µL (100µM d3-MG-H1)	7 µL (200µM d2-CML + 2mM d3-MG-H1)
Água	965 µL	658 µL
Volume final	1 mL	700 µL

Para a dosagem de CML e MG-H1, o preparo das amostras foi realizado em conjunto (mesmo tubo e mesma hidrólise), entretanto as dosagens foram realizadas separadamente para cada uma das biomoléculas.

Fornecedor dos padrões *Poly Peptides Laboratory*, Neo MPS.

Após o preparo desta mistura, o volume final (1mL) de pentosidina foi transferido para uma ampola e foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 6M. Para a CML+MG-H1 foram transferidos 600µL e adicionados 600 µL de HCl. As amostras foram então submetidas à hidrólise ácida em estufa (6M HCl, 110°C, 18 horas).

Para a quantificação do CML e MG-H1, os hidrolisados foram submetidos a um processo de evaporação em capela de fluxo laminar. Este processo é feito sob uma corrente de nitrogênio e tem a finalidade de secar e concentrar as amostras. O

nitrogênio é comumente utilizado durante o preparo de amostras para análises químicas, pois concentra e reduz o volume das amostras líquidas. O solvente evapora desta forma, restando no tubo o soluto desejado. Os hidrolisados secos foram então submetidos à resuspensão com o uso de 100µL de tampão formiato de amônio 125mM e filtrados utilizando os filtros Uptidisc PTFE (4 mm, 0.45 µm, Interchim, França) antes da análise por LC-MS/MS.

Para a quantificação da molécula de pentosidina, o pH dos hidrolisados foi ajustado para 1,5 (1,2mL NaOH 30% + 2,1mL NaHCO₃ 1M) e depois foram submetidos a uma etapa pré-purificação através da extração de fase sólida utilizando coluna Strata-X-C (Phenomenex, França). Após a eluição da coluna SPE usando 5% (v/v) de amônia em metanol, as amostras foram submetidas ao processo de concentração sob corrente de nitrogênio, resuspensas em tampão formiato de amônio 100mM e filtradas da mesma forma que para a dosagem de CML e MG-H1.

A quantificação de CML por LC-MS/MS foi realizada usando a coluna Kinetex HILIC (100 x 4,6mm, 2,6µm- Phenomenex, França) com o programa de gradiente composto por 5mM de formiato de amônio (pH 2,9) como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B (30seg 90% B; 1,5min 5% B; 3,10min 40% B; 4,00min 90% B; 5,30min 5% B; 7,00min 90% B).

A detecção das biomoléculas foi realizada no modo positivo com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) com os seguintes parâmetros: gás de cortina 40 psi, gás de colisão 6 psi; gás de nebulização 1, 40 psi; gás de nebulização 2, 60 psi; voltagem íon spray +5.500V e temperatura da fonte de 600°C para a CML, 750°C para o MG-H1 e pentosidina e 650°C para a lisina. A alta temperatura da fonte é necessária para que ocorra uma boa dessolvatação (transformação rápida do solvente líquido em gás; mais precisamente em microgotículas que serão em seguida aspiradas para dentro do espectrômetro de massas). O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e o argônio foi utilizado como gás de colisão.

Foram utilizadas várias transições de reação de fragmentação (denominadas de transições de quantificação (Tq) e de confirmação (Tc)) através do monitoramento de reações de fragmentação (MRM): 205,1> 130,1 para CML e 207,1> 84,1 para d₂-CML. Para o MG-H1 e a pentosidina, a separação cromatográfica foi realizada através de coluna PFP Kinetex (100 x 4,6mm, 2,6µm- Phenomenex, França) com programa de gradiente composto por formiato de amônio 5mM (pH 2,9) como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B (para o MG-H1:

0,50seg 0% B; 2,20min 40% B; 2,60min 95% B; 3,70min 0% B; para a pentosidina: 0,50seg 90% B; 1,00min 50% B; 2,50min 10% B; 3,80min 90% B). A coluna PFP foi escolhida para a quantificação da pentosidina após a realização de alguns testes que indicaram melhor separação e melhor intensidade dos picos. A detecção foi realizada no modo de íon positivo com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). As transições utilizadas foram: 379,2> 135,1 para a pentosidina; 229,2> 166,1 para o MG-H1 e 232,2> 169,1 para d₃-MG-H1. A concentração de lisina no hidrolisado foi quantificada por LC-MS/MS, a fim de normalizar a expressão dos resultados. A dosagem da lisina foi realizada a partir dos hidrolisados de CML+MG-H1. Foi preparada uma diluição 1:10: à 5 µL do hidrolisado puro foram adicionados 45 µL de tampão formiato de amônio 125mM contendo 65 µM de padrão interno de lisina (DL-lisina-3,3,4,4,5,5,6,6-d₈ 2HCl; fornecedor *CDN Isotopes*, número D-2715). A partir desta diluição foram realizados ensaios de diluições (1:100; 1:200; 1:300) para identificar a melhor diluição para a dosagem da lisina, utilizando tampão formiato de amônio 5mM.

O espectro de massa e os cromatogramas foram adquiridos e processados pelo software Analyst, versão 1.5.1 (ABSciex), que acompanha o equipamento.

O cálculo das concentrações foi baseado na área dos picos das transições e do padrão interno. A partir da equação da reta, obtida através da curva do padrão (diluição seriada), foi realizado o cálculo das concentrações das biomoléculas analisadas, como apresentado abaixo. Em todas as análises a matriz branca (MB) contendo todos os componentes da reação exceto o soro, foi empregada a fim de normalizar o sinal da reação.

Equação da reta: **$y = ax + b$**

Sendo:

y= Razão entre a transição de quantificação e o padrão interno (Tq/PI)

a= ângulo de inclinação da reta de regressão

b= intercepto

Para calcular a concentração da pentosidina, CML, MG-H1 e lisina= $\frac{((Tq/PI) - b)}{a}$

A concentração final dos AGEs, foi obtida pela razão entre os AGEs e a lisina medidos na mesma amostra, resultando nas razões CML/Lisina (mmol/mol de lisina); MG-H1/Lisina (mmol/mol de lisina) e Pentosidina/Lisina ($\mu\text{mol/mol}$ de lisina) que foram utilizadas no presente estudo.

A imprecisão analítica (inter-ensaio) correspondem à razão entre o desvio padrão e a média (CVa %) ao longo de várias dosagens ($n=10$ ou $n=20$) em diferentes séries de amostras preparadas. Para a pentosidina o CVa foi de 10% e para as outras biomoléculas entre 5 e 6%.

4.10 Análises estatísticas

Nas variáveis contínuas a normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov nos grupos em estudo.

As comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras independentes ou pela análise de variância (ANOVA) quando pertinente. Variáveis com distribuição normal são descritas como média \pm 1-desvio padrão.

Variáveis sem distribuição normal foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica). As variáveis são apresentadas como mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

Para as análises de correlação linear (Pearson) e nos estudos de associação de variáveis genéticas com os parâmetros laboratoriais e dados clínicos das pacientes, são apresentados o coeficiente de correlação (r) e a probabilidade da análise ou análise de variância (ANOVA), neste caso tendo o polimorfismos como variável classificadora. Para estas análises os genótipos foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

Para comparação das variáveis discretas foram utilizados os testes de Qui-quadrado (χ^2) ou o Teste Exato de Fisher bidirecional conforme apropriado, bem como tabelas de contingência disponíveis em http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html.

Para a obtenção e cálculos das comparações envolvendo frequências alélicas e genóticas, incluído as análises do intervalo de confiança de 95% (95%IC) e equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o programa DeFinetti, disponível em <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

Para as comparações entre as frequências alélicas observadas no estudo com outros trabalhos publicados, foram considerados resultados similares quando a frequência do alelo raro observada se enquadrava dentro dos limites do intervalo de confiança de 95% (95% IC). Frequências fora desta faixa foram consideradas diferentes.

O programa Statistica para Windows 8.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para as análises estatísticas.

As curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foram desenvolvidas e analisadas segundo (PARK; GOO e JO, 2004). Para as análises com gestantes em diferentes períodos da gestação, foram selecionados o mesmo número de indivíduos (n=72) para os grupos controle e DMG para os quatro períodos estudados (1) 12-23 semanas; (2) 24-28 semanas, (3) 29-32 semanas e (4) superior a 32 semanas. O programa utilizado foi o MedCalc v.7.12.7.2.0 (MedCal Software bvba).

Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

4.11 Fluxograma de trabalho

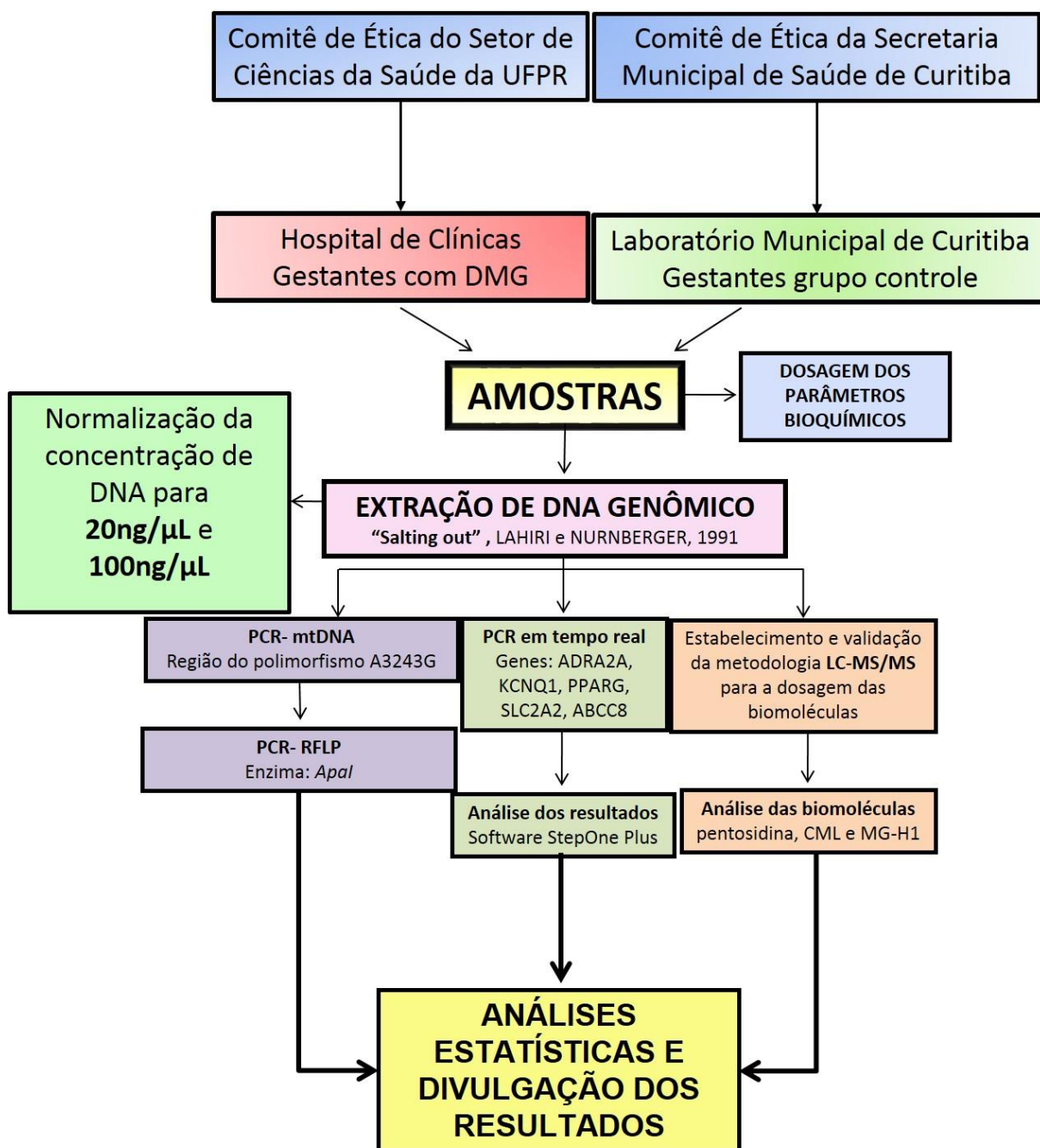


FIGURA 24- FLUXOGRAMA DE TRABALHO.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados em cinco tópicos: a caracterização da amostra (5.1), as análises bioquímicas (5.2), os produtos de glicação avançada (5.3), as análises moleculares (5.4) e as análises de correlação linear de Pearson (5.5.).

5.1 Caracterização da amostra

A análise estatística descritiva incluindo média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil (Q1e Q3) foi realizada e os valores estão descritos na Tabela 16, para os grupos em estudo.

TABELA 16- CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=506)	DMG (n=308)	P
Idade (anos)	26 (21-30)	32 (28-36)	<0,001
Etnia (%)			
Euro-Brasileiras	ND	89,7	
Afro-Brasileiras	ND	10,3	
Semana de gestação ao diagnóstico	14 (11-22)	31 (29-34)	<0,001
Peso (kg)	63,35 (56,5-70,0)	82,00 (70,5-94,3)	<0,001
Altura (m)	1,62 (1,57-1,65)	1,60 (1,55-1,65)	0,002
IMC (kg/m ²)	24,04 (21,80-27,33)	32,02 (28,04-36,93)	<0,001
PAS (mmHg)	110 (100-110)	120 (110-120)	<0,001
PAD (mmHg)	60 (60-70)	70 (70-80)	<0,001
Hipertensão arterial* (%)	1,2	32	
Tabagismo* (%)			
Não fumante	ND	56,2	
Ex-fumante	ND	30,4	
Fumante	ND	13,4	
Uso de insulina* (%)	NA	34,9	
Macrossomia* (%)	NA	17,6	

Variáveis sem distribuição normal: mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3)

ND: Dados não disponíveis; NA: Dados não aplicados para o grupo em questão.

PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica

IMC: Índice de massa corpórea; *Critérios descritos no item 4.2.1 do Material e Métodos.

A idade entre os grupos foi diferente (32 anos vs 26 anos para os grupos DMG e CTRL, respectivamente). As gestantes do grupo DMG são mais velhas ($p < 0,001$) do que as do grupo controle. A etnia foi predominantemente de Euro-Brasileiras. A semana de gestação foi de 31 vs 14 semanas para os grupos DMG e CTRL, respectivamente. As gestantes diabéticas apresentam IMC superior às controles e são mais hipertensas (32% vs 1,2%). 34,9% das gestantes diabéticas precisaram fazer uso da insulina para controle glicêmico, 17,6% apresentaram macrossomia, complicação para o feto associada ao diabetes; e 13,4% delas fumavam ainda na gestação.

5.1.1 Idade

A mediana da idade entre as gestantes avaliadas foi significativamente maior naquelas com DMG (32 anos vs 26 anos do grupo CTRL), como apresentado na Tabela 14. Este dado confirma o fato de que a idade por si só é um fator de risco independente para o diabetes gestacional. O risco para o desenvolvimento do DMG aumenta significativamente com a idade da gestante (COUSTAN, 1989). A idade é utilizada como fator de risco em todo o mundo. Na maioria dos países idade superior a 25 anos é fator de risco para o DMG (ACOG, 2001; BERGER *et al.*, 2002; SCOTT *et al.*, 2002; BRODY; HARRIS e LOHR, 2003; VIDAEFF; YEOMANS e RAMIN, 2003), enquanto em outros considera-se idade superior a 30 anos (COUSTAN *et al.*, 1989). Na amostra analisada a mediana obtida foi de 32 anos para as gestantes diabéticas, dado em conformidade com os achados na literatura. Idade inferior a 25 anos de idade está associada a baixo risco para DMG (METZGER *et al.*, 2007), o que também está de acordo com a idade observada para o grupo controle avaliado.

5.1.2 Semana de gestação

Para a semana de gestação o grupo DMG apresentou mediana de 31 semanas enquanto o grupo CTRL apresentou mediana de 14 semanas. A diferença observada se deve em primeiro lugar aos critérios empregados para a triagem destas pacientes nos centros em que as amostras foram coletadas. As gestantes controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba que em conjunto com a

Secretaria de Saúde do Estado do Paraná realizam um programa denominado Mãe Curitibana, que visa o acompanhamento das gestantes desde a concepção até o nascimento. Então estas gestantes foram obtidas em período mais precoce da gestação, efeito desejável do programa. Quando as gestantes triadas por este programa apresentam alteração nos níveis de glicemia e há confirmação do DMG, elas são encaminhadas para centros especializados, dentre eles o Hospital de Clínicas da UFPR, local em que foram obtidas as amostras de gestantes diabéticas. Levando-se em conta que o período adequado para a detecção do DMG é entre 24-28 semanas de gestação (AMERICAN DIABETES, 2013), e que estas gestantes precisam ser encaminhadas ao HC, é que se observa um período mais tardio da gestação nestas mulheres, cerca de 30 semanas de gestação.

5.1.3 Etnia

A etnia observada no grupo DMG estudado foi predominantemente de Euro-Brasileiras (89,7%), o que indica que nosso estudo reflete o perfil deste segmento da população. Estes dados estão em acordo com os dados disponíveis para a população do Paraná, mais especificamente Curitiba e região, onde a maioria da população é de origem Euro-Brasileira (77,4%) e há apenas 2,9% de negros (Dados do Censo, 2000). Esta informação não estava disponível para o grupo controle, por isso não foram possíveis comparações neste aspecto. O sistema do Laboratório Municipal de Curitiba não contempla esta informação. Embora o fator étnico seja relevante para estudos genéticos, não se tem razões para suspeitar de que o grupo CTRL não apresenta uma proporção étnica similar ao grupo DMG, visto que ambos os grupos são provenientes da mesma região demográfica.

5.1.4 Índice de massa corpórea (IMC)

O IMC foi superior nas gestantes do grupo DMG (32,02 kg/m²) quando em comparação com as gestantes do grupo CTRL (24,04 kg/m²). IMC superior a 25 kg/m² (SOLOMON *et al.*, 1997; TURHAN *et al.*, 2003) ou a 27 kg/m² (KHINE; WINKLESTEIN e COPEL, 1999) são descritos na literatura com fatores de risco importantes para a manifestação do diabetes (preditores de DMG). O fato do grupo controle ter sido obtido em período mais precoce da gestação, pode explicar a

diferença encontrada. Este grupo certamente teve um ganho de peso com a evolução da gestação. Em gestantes com DMG, a resistência à insulina induz uma liberação compensatória de insulina pelo pâncreas, o que pode aumentar o ganho de peso ponderal nestas pacientes.

5.1.5 Hipertensão arterial e tabagismo.

A hipertensão afeta de 5-10% das gestantes (WALKER, 2000). A hiperinsulinemia e a dislipidemia, quando associados ao DMG, podem induzir a hipertensão (CASEY *et al.*, 1997). Mulheres com hipertensão antes da gestação (5 anos) ou durante o primeiro trimestre de gestação apresentam duas vezes mais chances de desenvolver DMG (HEDDERSON e FERRARA, 2008). Em nosso estudo, 32% das gestantes com diabetes gestacional apresentaram hipertensão, significativamente superior ao 1,2% observado no grupo controle.

A nicotina tem efeito vasoconstritor nos vasos da placenta e no feto (BENOWITZ, 1999). O fumo durante a gestação é um fator de risco independente de mudança na composição corporal do filho. Filhos de mulheres que fumaram durante a gestação, apresentam baixos níveis de HDL-C e LDL-C (JADDOE *et al.*, 2008), nascem menores e podem crescer rapidamente na infância e posteriormente tornarem-se obesos ou apresentar sobrepeso (ONG *et al.*, 2002; TOSCHKE *et al.*, 2003; ADAMS; HARVEY e PRINCE, 2005). As consequências que o fumo pode provocar durante a gestação são graves, ainda assim, na amostra estudada, 13,4% das gestantes com diabetes gestacional continuaram a fumar durante a gestação. Dados para o grupo controle não estavam disponíveis para comparação.

5.1.6 Uso de insulina e complicações associadas ao diabetes gestacional

Outras observações importantes analisadas incluem o uso de insulina e a macrossomia, complicação associada ao DMG. 34,9% das gestantes do grupo DMG precisaram fazer uso da insulina para manter os níveis de glicemia normais. Isso indica que as alterações na dieta não foram suficientes para controlar os níveis de glucose. Mesmo com o controle glicêmico, 17,6% das gestantes desenvolveram alguma complicação associada ao diabetes, neste caso a macrossomia, ou seja, o feto nasceu grande (mais de 4kg) porém com os órgãos ainda imaturos. Este fato

confirma a importância do diagnóstico, acompanhamento e controle do DMG na gestação, a fim de evitar estas complicações associadas.

5.2 Análises bioquímicas

Foram analisados parâmetros bioquímicos descritos no item 4.8 e a Tabela 17 mostra os resultados obtidos para os grupos em estudo. As determinações de HbA1C e glicemia 2 horas após ingestão oral de 75g de glucose (2-h 75g de glucose) foram realizadas apenas no grupo DMG.

TABELA 17- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.

Parâmetros	Controle (n=506)	DMG (n=308)	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	82 (78-87)	93 (92-106)	<0,001*
2-h 75g de glucose (mg/dL)	ND	162 (148-180)	ND
HbA1C (%)	ND	5,6 (5,3-6,1)	ND
1,5 anidroglicitol	15,3±8,3	9,6±4,9	<0,001
Colesterol (mg/dL)	188 (160-224)	224 (196-260)	<0,001*
HDL-C (mg/dL)	55 (47-65)	55,5 (47-64)	0,596
LDL-C (mg/dL)	109,4 (90,2-134,6)	125,8 (99-152,2)	<0,001*
Triglicérides (mg/dL)	107 (83-139)	219 (178-271)	<0,001*
Log (TG/HDL-C)	0,30±0,20	0,60±0,19	<0,001
Colesterol não-HDL-C (mg/dL)	130,5 (109-162)	169,0 (142-201)	<0,001*
Proteína Total (g/dL)	6,9 (6,5-7,4)	6,4 (6,0-6,7)	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,0 (3,7-4,5)	3,4 (3,1-3,6)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,7-0,8)	0,7 (0,6-0,7)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	21 (17-25)	16 (13-19)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,6 (3,1-4,1)	4,4 (3,8-5,2)	<0,001*

Os resultados para as variáveis são apresentados como: Média \pm 1-DP ou Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) e amplitude de variação [AV]. P, probabilidade com o teste t para variáveis independentes (variáveis com distribuição normal) ou * Mann-Whitney para variáveis sem distribuição normal.

ND: Dados não disponíveis.

LDL-C: Obtido pela equação de Friedewald.

Colesterol não-HDL-C: Obtido pela equação (Colesterol total- HDL-C).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, a glicemia de jejum, o colesterol total, o LDL-C, os triglicérides, o Log (TG/HDL-C), o colesterol não-HDL-C e o ácido úrico apresentaram concentrações séricas maiores ($P < 0,001$) no grupo DMG quando comparados ao controle saudável. O 1,5AG foi mais baixo nas gestantes DMG do que nas gestantes controle bem como a proteína total, a albumina, a creatinina e a ureia, ainda que alguns destes parâmetros estejam dentro dos valores de referência normais. O único parâmetro avaliado que não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos foi o HDL-C ($P = 0,596$).

5.2.1 Marcadores de controle glicêmico

Dentre os parâmetros bioquímicos analisados, os marcadores glicêmicos foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Tabela 17). Este resultado era esperado em virtude dos critérios de classificação amostral adotados e descritos no item 4.2.1, Material e Métodos. A glicemia 2 horas pós sobrecarga de glucose para o grupo DMG confirma o diagnóstico de diabetes gestacional com valores de glicemia iguais ou superiores a 140mg/dL. A hemoglobina glicada é um marcador de controle glicêmico e os valores médios obtidos para o grupo DMG de 5,6% sugerem bom controle glicêmico nestas pacientes. Concentrações de HbA1C superiores a 6,5% indicam controle glicêmico inadequado e a necessidade de intervenção nutricional ou medicamentosa para que os níveis de glucose sejam controlados (BALAJI *et al.*, 2007; AMERICAN DIABETES, 2013). No grupo com diabetes o controle glicêmico avaliado pela HbA1C deve ser avaliado com cautela uma vez que cerca de 30% das diabéticas utilizam insulina. O resultado da HbA1C, portanto, pode refletir o efeito da terapia, mascarando um controle glicêmico inadequado.

O 1,5 anidroglucitol (1,5AG) é um marcador de controle glicêmico, caracterizado por ser um poliol plasmático presente na dieta e que durante a normoglicemia se mantém constante (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Na dieta está presente em cereais, carnes de gado e porco e em grãos de soja. Em condições fisiológicas normais, o 1,5AG é totalmente reabsorvido pelos rins (YAMANOUCHI *et al.*, 1989). Entretanto, quando a glicemia ultrapassa o limiar renal ($> 180\text{mg/dL}$), há uma redução das concentrações plasmáticas de 1,5AG consequente de uma inibição competitiva com a glucose para a reabsorção tubular proximal (DUNGAN, 2008). A glucose é reabsorvida aumentando sua concentração sanguínea e o 1,5AG

é eliminado pela urina reduzindo assim sua concentração. O 1,5AG reflete elevações transitórias da glucose (24-72 horas) podendo ser reavaliado dentro de 1 a 2 semanas (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Esta seria a sua vantagem em relação à HbA1C, o que permitiria um controle mais acurado e eficaz (JANUSZEWSKI *et al.*, 2012). A redução na concentração do 1,5AG está associada ao aumento na glicemia pós-prandial, importante parâmetro para o diabetes. A diferença observada entre os grupos foi significativa e esperada, devido a presença de hiperglicemia associada ao DMG. Estes achados foram similares ao descrito por Tetsuo e colaboradores (1990). Um trabalho do nosso grupo de pesquisa mostrou que o 1,5AG pode ser utilizado como um biomarcador na triagem do diabetes gestacional no início da gestação (Boritzka *et al.*, 2014 *In press*).

5.2.2 Proteína total e albumina

A concentração plasmática de proteína total e a albumina das gestantes com DMG foi significativamente inferior quando comparada ao grupo controle (Tabela 17). Estes marcadores indicam o estado nutricional das pacientes e a retenção de líquidos. De maneira geral, as gestantes com DMG não apresentam sinais de perda proteica importante.

Os achados para os grupos avaliados são similares àqueles descritos na literatura, em que a concentração de albumina é inferior em gestantes com DMG (MEGAHED e TAHER, 2004; KALE *et al.*, 2005). Está descrito na literatura que mulheres com diabetes e albumina normal apresentam um aumento de 3 a 4 vezes na excreção urinária de albumina após a 20ª semana de gestação (BIESENBACH e ZAZGORNIK, 1989; MCCANCE *et al.*, 1989). Este achado pode também explicar as diferenças observadas entre os grupos.

Outro fator importante a ser analisado é que durante a gestação há um aumento de 50% no sangue circulante (DAVISON e DUNLOP, 1980; CARPENTER, 2007) que ocorre devido à vasodilatação induzida por vários elementos. Como há um aumento no sangue circulante, há a presença de maior quantidade de água, o que pode explicar a diminuição na concentração da proteína total e albumina uma vez que o grupo DMG encontra-se em estágio mais avançado da gestação, estando mais sujeito à retenção de líquidos.

5.2.3 Ureia e creatinina

Para os marcadores de função renal ureia e creatinina, as concentrações séricas obtidas foram significativamente menores no grupo DMG em relação ao grupo controle (Tabela 17). As concentrações médias obtidas sugerem que os grupos em estudo não apresentam alteração relevante na função renal. Este dado reforça que não foram selecionadas pacientes com insuficiência renal, como proposto no Material e Métodos (item 4.2.1).

O número de gestantes com HAS (~30%) no grupo DMG pode explicar as diferenças encontradas. A hipertensão associada ao aumento do volume sanguíneo aumenta a filtração glomerular, que por sua vez aumenta o *clearance* de ureia e creatinina (LINDHEIMER; TALER e CUNNINGHAM, 2008; BURTIS, 2001). Além disso da mesma forma descrita para a proteína total e albumina, estes compostos estão sujeitos à hemodiluição associada ao aumento do volume sanguíneo.

O aumento do fluxo urinário, potencializado pela hiperglicemia, em pacientes com DMG também pode explicar esta diferença (POWE e THADHANI, 2011).

5.2.4 Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente superior nas gestantes com DMG quando comparadas às gestantes do grupo controle (Tabela 17).

O ácido úrico é um fator de risco independente para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, associado mais fortemente às mulheres (COUTINHO TDE *et al.*, 2007). Na gestação, o ácido úrico está correlacionado com a resistência à insulina em mulheres com hipertensão gestacional (WEISZ *et al.*, 2005). Interessante observar que a hiperuricemia no primeiro trimestre de gestação, está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de DMG, independente do índice de massa corpórea (LAUGHON *et al.*, 2009).

A elevação do ácido úrico no grupo DMG pode estar associada à resistência à insulina e a hipertensão como sugerem Yoo e colaboradores (2005) e Laughon e colaboradores (2009) (YOO *et al.*, 2005; LAUGHON *et al.*, 2009).

5.3 Perfil lipídico e análises do índice aterogênico do plasma (Log(TG/HDL-C))

O comportamento dos grupos em relação ao perfil lipídico apresentou elevação nas concentrações séricas do colesterol, triglicérides, LDL-C, Log (TG/HDL-C) e colesterol não-HDL-C no grupo DMG quando comparado ao grupo controle (Tabela 17). Somente o HDL-C não mostrou diferença significativa entre os grupos analisados.

O metabolismo lipídico é fundamental para o desenvolvimento de uma gestação saudável (DI CIANNI *et al.*, 2003). O colesterol é usado pela placenta para a síntese de hormônios esteroides, enquanto os ácidos graxos são oxidados e utilizados para a síntese de membranas celulares (DI CIANNI *et al.*, 2003). Alterações no metabolismo lipídico ocorrem para garantir o aporte de nutrientes para o crescimento fetal e são importantes também nas consequências tardias da gestação (MARSEILLE-TREMBLAY *et al.*, 2008), apesar da dificuldade dos lipídeos em atravessar a placenta (HERRERA, 2002). Estas alterações são progressivas e em mulheres com DMG podem ser acentuadas (BUTTE, 2000). O DMG induz um estado de dislipidemia consistente com a resistência à insulina.

Gestantes com DMG apresentam concentrações séricas mais elevadas de triglicérides do que gestantes sem diabetes (BUTTE, 2000; MCGROWDER *et al.*, 2009). Estes dados de Butte, N. (2000) estão em acordo com os resultados obtidos para a nossa população de gestantes diabéticas que apresentou concentrações mais elevadas de triglicérides e conseqüentemente maior razão Log(TG/HDL-C) do que as gestantes do grupo controle. Ainda de acordo com Butte, N. (2000) o colesterol total e o HDL-C não são diferentes entre as gestantes com DMG e gestantes saudáveis. Com relação ao HDL-C, nossos dados estão em acordo com os seus achados e com outros achados na literatura que não descrevem alterações significativas do HDL-C durante a gestação mesmo em gestantes com DMG (BUTTE, 2000; WIZNITZER *et al.*, 2009). Entretanto, para o colesterol total a concentração sérica obtida foi significativamente superior em gestantes diabéticas.

Para o perfil lipídico associado ao DMG, os principais parâmetros discriminadores entre os grupos foram as concentrações de triglicérides e a razão Log(TG/HDL-C). O índice aterogênico do plasma [AIP= Log (TG/HDL-C)] combina as concentrações séricas de triglicérides, que aumentam de maneira significativa no DMG, e o HDL-C que é mais estável e tende a normalizar a razão entre as

pacientes. Ao avaliarmos este índice observamos que as pacientes com DMG apresentam concentrações elevadas em comparação às gestantes saudáveis (Tabela 17). Não há na literatura outros grupos que descrevam a relação deste índice com o DMG para comparação.

Uma análise mais acurada deste parâmetro foi realizada para verificar a variação na sua concentração nos diferentes períodos de gestação a fim de avaliar se este índice poderia ser utilizado como marcador de risco e/ou proteção para o DMG.

Para as análises com o índice aterogênico do plasma (AIP) calculado pelo Log(TG/HDL-C) , foi utilizado um subgrupo das amostras totais correspondendo a 576 gestantes (DMG=288 e CTRL=288), uma vez que a análise foi realizada por período gestacional (semanas). Os grupos foram pareados por idade ($P=0,101$) e divididos em 4 grupos:

- A. 12-23 semanas de gestação;
- B. 24-28 semanas de gestação;
- C. 29-32 semanas de gestação;
- D. >32 semanas de gestação.

O Log(TG/HDL-C) foi calculado através do logaritmo da razão dos TG/HDL-C, ambos expressos em mg/dL. A tabela 18 apresenta os dados obtidos para o subgrupo de gestantes analisadas.

TABELA 18- PARÂMETROS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS SUBGRUPOS ESTUDADOS.

Parâmetros	CTRL (n= 288)	DMG (n= 288)	P
Idade (anos)	32,5(28,0-34,0)	33,1(30,0-37,0)	0,101*
IMC (kg/m ²)	26,1±4,7	33,4±6,4	<0,001
Hipertensão (%)	3,5	14,7	<0,001**
Glicemia de jejum (mg/dL)	84,7(79,3-88,3)	93,7(86,5-100,9)	<0,001*
HbA1C (%)	-	5,7(5,3-6,1)	-
Creatinina (mg/dL)	0,8(0,7-0,9)	0,7(0,6-0,7)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,6(3,1-3,9)	4,5(3,8-5,2)	<0,001*
CT (mg/dL)	196,9±46,3	227,8±46,3	<0,001
HDL-C (mg/dL)	57,9±15,4	54,1±11,6	0,042
LDL-C (mg/dL)	112,0(96,5-142,8)	127,4(100,4-146,7)	0,033*
TG (mg/dL)	106,2(79,6-141,6)	221,2(177,0-274,3)	<0,001*
Colesterol não HDL-C (mg/dL)	3,6(2,9-4,4)	4,4(3,7-5,2)	<0,001*
CT/HDL-C	3.6(3.0-4.5)	4.1(3.4-4.9)	<0,001*
LDL-C/HDL-C	2.1(1.6-2.9)	2.3(1.7-2.8)	0,961*
AIP (LogTG/HDL-C)	0,317±0,20	0,601±0,19	<0,001

Dados apresentados como média±1-DP; mediana (25%-75%) ou %

AIP, índice aterogênico do plasma: log(TG/HDL-C); IMC, índice de massa corpórea; HDL-C, HDL-colesterol; LDL-C, LDL-colesterol; CT, colesterol total; TG, triglicerídeos.

Hipertensão (pressão arterial: Sistólica>140mmHg ou Diastólica> 90mmHg).

Valor de P, teste t para variáveis independentes; * teste de Mann-Whitney U ou ** teste Chi-square.

O único parâmetro laboratorial que não foi estatisticamente diferente entre os grupos foi a razão LDL-C/HDL-C (P=0,961). Os marcadores de controle glicêmico (glicemia de jejum e HbA1C) indicam que as pacientes com DMG apresentam bom controle glicêmico.

As tabelas 19 e 20 apresentam as concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos nos diferentes períodos da gestação analisados em cada um dos grupos.

TABELA 19- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NOS DIFERENTES PERÍODOS GESTACIONAIS ANALISADOS NO GRUPO CONTROLE.

CTRL, n=288 (Semanas de gestação)					
Semanas	12-23	24-28	29-32	>32	P
Glucose	84,7(79,3-88,3)	84,7(79,3-88,3)	81,81(79,3-86,5)	81,1(75,7-84,7)	0,231
CT	185,3±34,7	227,8± 46,3	239,4±50,2	243,2±50,2	<0,001
HDL-C	54,1±15,4	61,8±15,4	61,8±15,4	61,8±0,5	0,017
LDL-C	108,1(88,8-123,5)	142,8(111,9-166,0)	138,9(104,2-150,6)	135,1(111,9-154,4)	<0,001
TG	97,3(79,6-123,9)	150,4(115,0-185,8)	168,1(123,8-212,4)	176,9(123,8-194,6)	<0,001
CT/HDL-C	127,4(111,9-154,4)	138,9(119,7-169,9)	150,6(123,5-200,7)	146,7(119,7-162,2)	0,004
AIP	0,275±0,18	0,402±0,16	0,473±0,21	0,517±0,23	<0,001

Tamanho amostral: 72 gestantes em cada período gestacional. Cada subgrupo foi pareado por idade.

Dados apresentados como média±1-DP ou mediana (25%-75%)

Glucose (mg/dL); AIP, índice aterogênico do plasma, log(TG/HDL-C); CT, colesterol total (mg/dL); HDL-C, HDL-Colesterol (mg/dL); LDL-C, LDL-Colesterol (mg/dL); TG, triglicerídeos (mg/dL); CT/HDL-C, colesterol total/HDL-C. Valor de P obtido com o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA comparando os quatro períodos estudados para os grupos controle e DMG.

TABELA 20- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NOS DIFERENTES PERÍODOS GESTACIONAIS ANALISADOS NO GRUPO DMG.

DMG, n=288 (Semanas de gestação)					
	12-23	24-28	29-32	>32	P
Glucose	120,7(109,9-142,3)	99,1(88,3-113,5)	91,9(84,7-102,7)	91,9(84,7-100,9)	<0,001
CT	193,1±38,6	216,2±46,3	227,8±50,2	239,4±46,3	0,001
HDL-C	46,3±11,6	57,9±11,6	57,9±11,6	54,1±11,6	0,003
LDL-C	96,5(69,5-115,8)	100,4(88,8-138,9)	123,5(100,4-154,4)	135,1(108,2-150,6)	0,009
TG	221,2(176,9-283,2)	194,7(159,3-238,9)	221,2(176,9-274,3)	238,9(203,5-300,8)	0,004
CT/HDL-C	142,8(131,3-200,7)	138,9(111,9-158,4)	158,3(131,3-173,7)	169,8(142,8-189,2)	0,012
AIP	0,636±0,23	0,565±0,19	0,574±0,17	0,638±0,19	0,005

Tamanho amostral: 72 gestantes em cada período gestacional. Cada subgrupo foi pareado por idade.

Dados apresentados como média±1-DP ou mediana (25%-75%) Glucose (mg/dL); AIP, índice aterogênico do plasma, log(TG/HDL-C); CT, colesterol total (mg/dL); HDL-C, HDL-Colesterol (mg/dL); LDL-C, LDL-Colesterol (mg/dL); TG, triglicerídeos (mg/dL); CT/HDL-C, colesterol total/HDL-C. Valor de P Kruskal-Wallis ANOVA comparando os quatro períodos estudados para os grupos controle e DMG.

No grupo de gestantes saudáveis, não houve diferença significativa na concentração da glicose de jejum nos quatro períodos analisados, conforme mostra a tabela acima. As gestantes diabéticas apresentam concentrações maiores de glicemia de jejum quando comparadas às gestantes saudáveis, e estas concentrações foram diferentes nos quatro períodos analisados ($P<0,001$). As gestantes diabéticas apresentaram maior concentração de glicemia de jejum no primeiro período avaliado (12-23 semanas).

As análises das curvas ROC dos parâmetros avaliados, exceto do AIP, mostraram baixo poder de discriminação entre os grupos controle e DMG. O índice aterogênico do plasma (AIP) foi o melhor discriminador entre os grupos, especialmente no primeiro período da gestação (12-23 semanas) como apresentado na Figura 25.

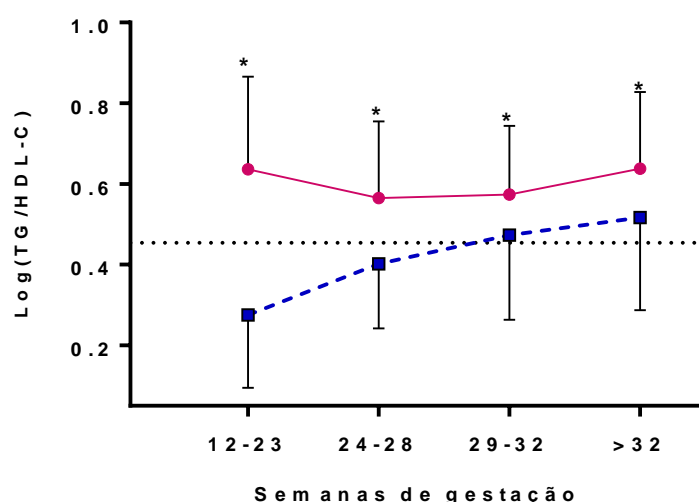


FIGURA 25- ÍNDICE ATEROGÊNICO DO PLASMA (AIP) EM DIFERENTES PERÍODOS DA GESTAÇÃO NOS GRUPOS ANALISADOS.

Os quadrados azuis e a linha tracejada representam o grupo de gestantes saudáveis (CTRL); os círculos vermelhos e a linha sólida representam as gestantes com diabetes (DMG). O valor do AIP de 0,454 (linha preta pontilhada) foi o valor que melhor discriminou os grupos no primeiro período da gestação (12-13 semanas).

* $P<0,001$ em cada período.

A análise da curva ROC do AIP, apresentou um *cut-off* de 0,454 (com área embaixo da curva de 0,886, $P<0,001$) com 82,6% de sensibilidade e 83,4% de especificidade, no primeiro período analisado. Com o avanço da gestação, a área embaixo da curva bem como a sensibilidade e especificidade diminuem (Figura 26).

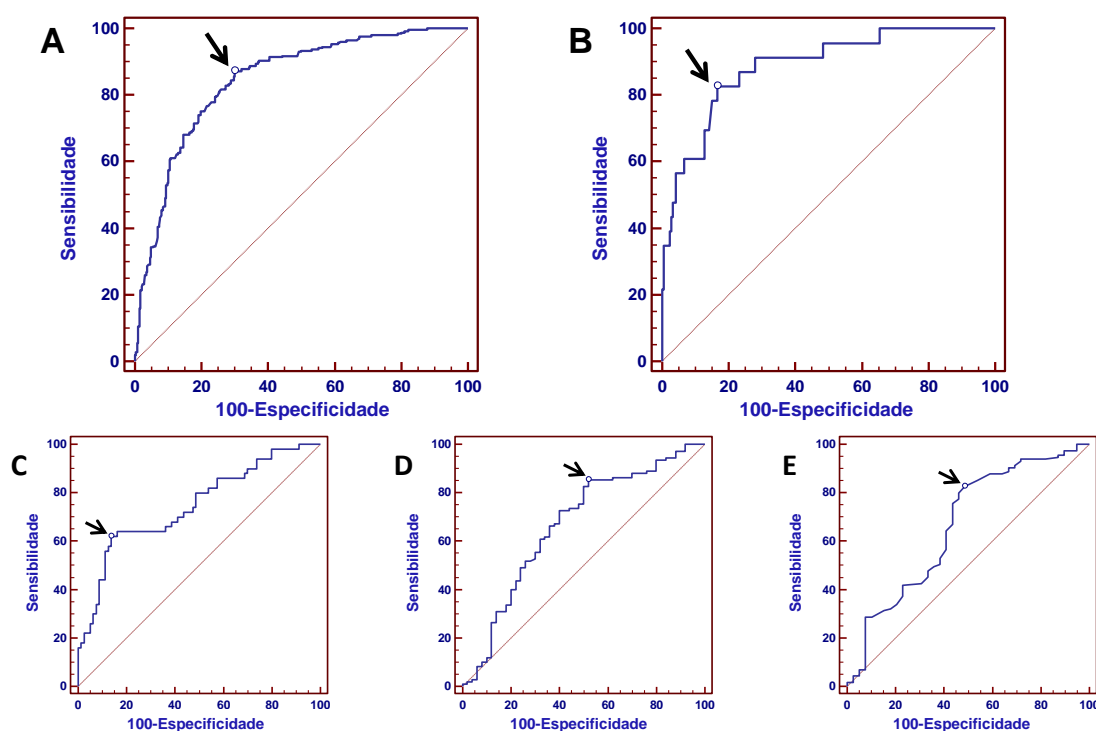


Figura	A	B	C	D	E
Parâmetros	Amostra total	12-23 semanas	24-28 semanas	29-32 semanas	>32 semanas
AUC	0,845±0,017	0,886±0,036	0,746±0,045	0,669±0,049	0,665±0,054
Ponto <i>cut-off</i>	0,437	0,454	0,549	0,424	0,475
Sensibilidade, %	86,7	82,6	62,0	85,5	82,6
Especificidade, %	69,9	83,4	86,2	48,0	51,3
Valor preditivo positivo, %	72,3	35,2	73,8	78,3	83,3
Valor preditivo negativo, %	85,8	97,8	78,4	60,0	50,0

FIGURA 26- CURVAS ROC PARA OS VALORES DE AIP NOS GRUPOS CONTROLE E DMG NOS PERÍODOS ANALISADOS.

A. Amostra total; B. 12-23 semanas de gestação; C. 24-28 semanas de gestação; D. 29-32 semanas de gestação; E. >32 semanas de gestação.

A seta indica o ponto de corte (*cut-off*). Este ponto apresenta o índice de Youden mais alto.

O AIP tem sido associado na literatura com a resistência à insulina (MCLAUGHLIN *et al.*, 2003; HANNON *et al.*, 2006), à síndrome metabólica (LAUENBORG *et al.*, 2005), como preditor de aterosclerose (DOBIASOVA e FROHLICH, 2001; TAN; JOHNS e GLAZER, 2004) e à dislipidemia (SOSKA *et al.*, 2011). Todas essas associações são fortemente relacionadas ao diabetes.

Como as concentrações séricas de triglicerídeos estão associadas ao diabetes gestacional (MCGROWDER *et al.*, 2009) e o HDL-C não muda significativamente durante a gestação mesmo na presença de DMG (BUTTE, 2000; WIZNITZER *et al.*, 2009), é que avaliamos este índice supondo que ele pudesse ser um bom preditor de diabetes na gestação. O AIP combina as concentrações de triglicérides que aumentam expressivamente no DMG com as concentrações de HDL-C mais estáveis e que tendem a normalizar a razão entre os indivíduos.

Em nossa população, o índice aterogênico de 0,454 determinado pelas análises da curva ROC, apresentou um valor preditivo negativo de 97,8%. Este alto valor preditivo negativo indica que gestantes com AIP abaixo do ponto de corte (0,454) apresentam baixa probabilidade de desenvolver DMG no início da gestação (12-23 semanas). Estes dados foram publicados no jornal *Clinica Chimica Acta*, 2013 e o artigo está no anexo 11 (DOS SANTOS-WEISS *et al.*, 2013).

Alguns estudos tem sugerido que mulheres com DMG desenvolvem hipertrigliceridemia nos estágios iniciais da gestação (VAN DEN ELZEN *et al.*, 1996; BUTTE, 2000), e que as concentrações de triglicerídeos são mais altas na preeclampsia no início da gestação (MCGROWDER *et al.*, 2009). Outro dado interessantes é a associação das concentrações de triglicérides com a massa de gordura fetal e com o peso do neonato (KNOPP *et al.*, 1992; KITAJIMA *et al.*, 2001; HERRERA e ORTEGA-SENOVILLA, 2010).

As diretrizes internacionais de diabetes recomendam o *screening* do DMG entre as 24ª e 28ª semanas (AMERICAN DIABETES, 2013), entretanto o AIP pode ser um marcador precoce auxiliar ao diagnóstico do DMG. Quanto mais precocemente o diagnóstico for realizado, menores serão os efeitos adversos associados à doença para a mãe e o feto/neonato.

A avaliação do perfil lipídico na gestação poderia ser uma ferramenta importante na detecção de mulheres com risco de doença arterial coronariana (TOESCU *et al.*, 2004) e/ou diabetes como indica o AIP (DOS SANTOS-WEISS *et al.*, 2013).

5.4 Análise dos produtos de glicação avançada (AGEs)

Em um subgrupo da amostra total (DMG=155 e CTRL=123) foram dosados os produtos de glicação avançada CML (carboximetilisina), MG-H1 (metilglioxal derivado hidroimidazolona-1), pentosidina e lisina. Esta etapa do projeto foi realizada na Université de Reims, Champagne-Ardenne, França, durante o período sanduíche, com a colaboração do coorientador Prof. Dr. Philippe Gillery e do Dr. Stéphane Jaisson.

A Tabela 21 mostra as características antropométricas e laboratoriais deste subgrupo.

TABELA 21- CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E LABORATORIAIS DO SUBGRUPO EMPREGADO NAS ANÁLISES DOS AGEs.

Parâmetros	Controle (n=158)	DMG (n=155)	P
Idade (anos)	29 (26-33)	32 (28-37)	<0,001*
Etnia (%)			
Euro-Brasileiras	ND	89,5	
Afro-Brasileiras	ND	10,5	
Semana de gestação ao diagnóstico	16 (12-24)	31 (28-34)	<0,001*
Peso (kg)	66,7 (59-74,3)	80,7 (71-94)	<0,001*
Altura (m)	1,60 (1,57-1,65)	1,60 (1,55-1,64)	0,094*
IMC (kg/m ²)	25,52 (22,63-28,44)	32,14 (27,82-36,98)	<0,001*
PAS (mmHg)	110 (100-120)	120 (110-126)	<0,001*
PAD (mmHg)	60 (60-70)	80 (70-80)	<0,001*
Hipertensão arterial* (%)	1,0	31,2	
Tabagismo* (%)			
Não fumante	ND	54,8	
Ex-fumante	ND	34,2	
Fumante	ND	11,0	
Uso de insulina* (%)	NA	36,1	
Macrossomia* (%)	NA	18,7	
Glicemia de jejum (mg/dL)	84 (80-88)	93 (92-106)	<0,001*
2-h 75g de glucose (mg/dL)	ND	160,5 (147-183)	
HbA1C (%)	ND	5,6 (5,3-6,1)	
1,5 anidroglicitol	13,6±7,18	9,37±4,67	<0,001
Colesterol (mg/dL)	197 (174-230)	222 (193-258)	<0,001*
HDL-C (mg/dL)	50,5 (39-64)	55 (47-65)	<0,001*
LDL-C (mg/dL)	119,9 (98,4-149,6)	125,8 (98,6-152,2)	0,826*
Triglicérides (mg/dL)	117,5 (90-157)	222 (183-271)	<0,001*
Log TG/HDL-C	0,37±0,21	0,60±0,20	<0,001
Colesterol não-HDL-C (mg/dL)	144,5 (120-182)	169 (140-201)	<0,001*
Proteína Total (g/dL)	7,1 (6,6-7,5)	6,3 (6,0-6,5)	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,3 (4,0-4,7)	3,5 (3,2-3,7)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,8-0,9)	0,7 (0,6-0,8)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	21 (17-24)	15 (13-19)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,5 (3,0-3,9)	4,4 (3,8-5,1)	<0,001*

Os resultados para as variáveis são apresentados como: Média \pm 1-DP ou Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) e amplitude de variação [AV]. P, probabilidade com o teste t para variáveis independentes (variáveis com distribuição normal) ou * Mann-Whitney para variáveis sem distribuição normal. Variáveis sem distribuição normal: mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3)
 ND: Dados não disponíveis; NA: Dados não aplicados para o grupo em questão.

As características do subgrupo, quando comparadas à amostra total, foram similares. Não foi observada nenhuma alteração relevante em nenhum dos parâmetros avaliados. Entretanto, deve ser ressaltado que a concentração de HDL-C no subgrupo foi significativa ($P < 0,001$) e na amostra total não ($P = 0,596$; tabela 17). Esta diferença pode advir do efeito do tamanho amostral e não foi considerada relevante no contexto geral, visto que os demais componentes do perfil lipídico apresentaram comportamento similar a amostra total.

Nas figuras 27-30 estão apresentados os perfis cromatográficos e espectrométricos obtidos para as moléculas analisadas individualmente, bem como as transições utilizadas para a caracterização das moléculas.

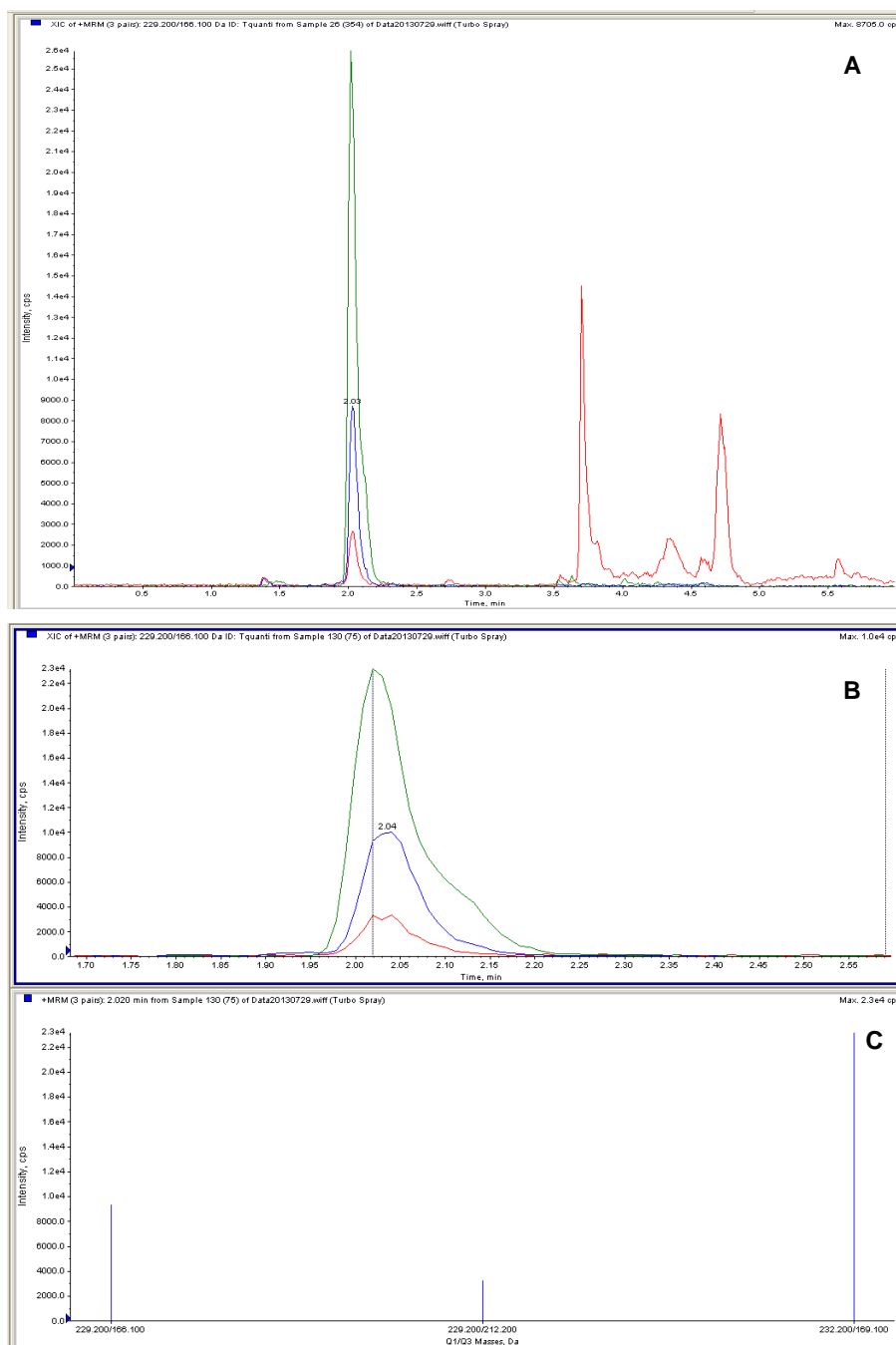


FIGURA 27- PERFIL DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CARBOXIMETILISINA (CML) POR LC-MS/MS.

Espectros de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Em verde o padrão interno (CML), em azul a transição de quantificação e em vermelho a transição de confirmação.

(A) Espectro de massa da molécula de CML com tempo de retenção da amostra de 2,82 minutos. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS, contagens por segundo) e tempo do ensaio (minutos), respectivamente.

(B) Maximização do espectro A para detalhamento das transições de reação através do monitoramento de reação múltipla (MRM) para a transição de confirmação (205,1>84,1), para o padrão interno (207,1>84,1) e para a transição de quantificação (205,1>130,1) da molécula de CML.

(C) Intensidade das transições. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS) e massa (relação Q1/Q3), respectivamente.

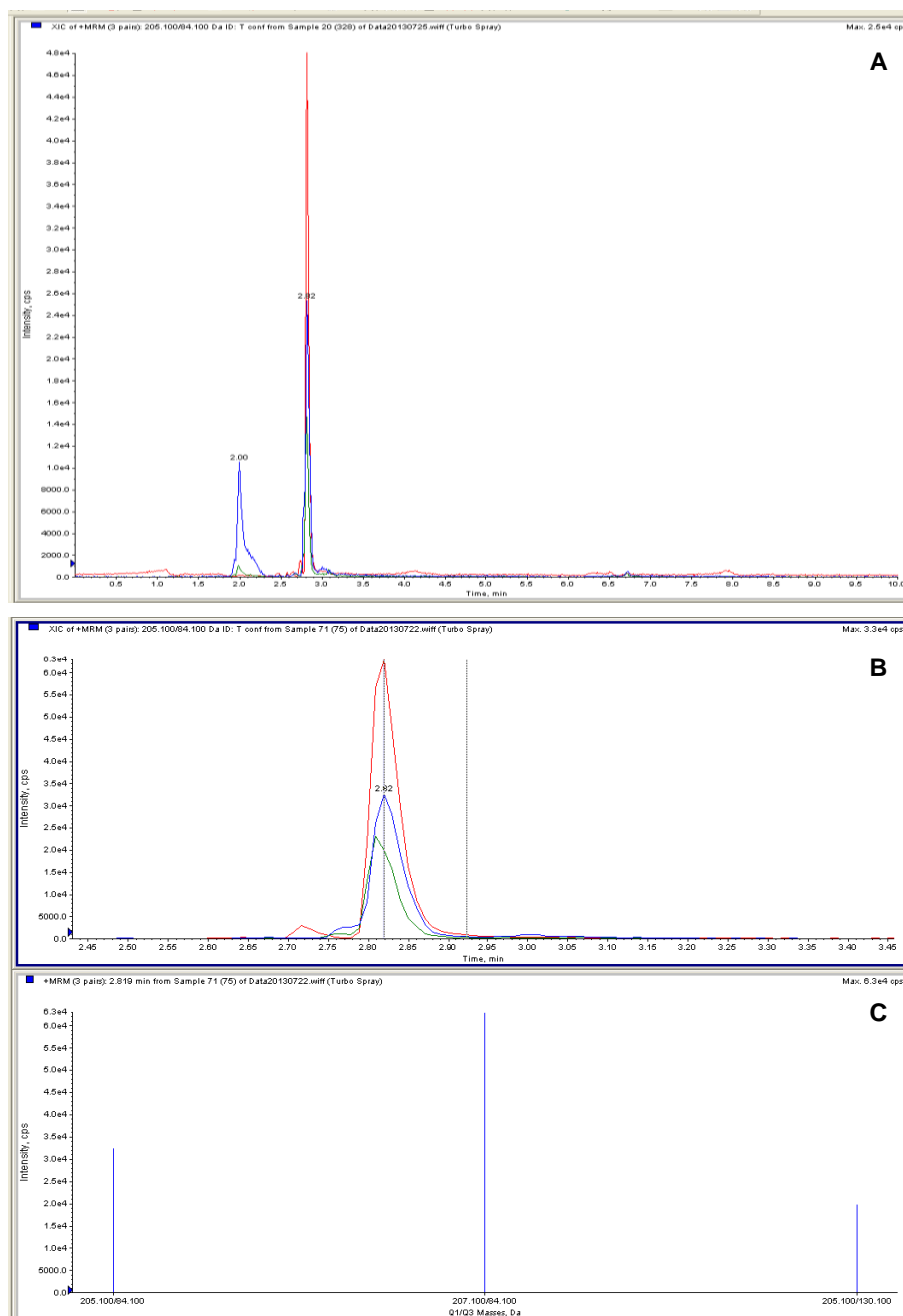


FIGURA 28- PERFIL DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO METILGLIOXAL DERIVADO HIDROIMIDAZOLONA-1 (MG-H1) POR LC-MS/MS.

Espectros de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Em verde o padrão interno (MG-H1), em azul a transição de quantificação e em vermelho a transição de confirmação.

(A) Espectro de massa da molécula de MG-H1 com tempo de retenção da amostra de 2,04 minutos. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS, contagens por segundo) e tempo do ensaio (minutos), respectivamente.

(B) Maximização do espectro A para detalhamento das transições de reação através do monitoramento de reação múltipla (MRM) para a transição de confirmação (229,2>212,2), para o padrão interno (232,2>169,1) e para a transição de quantificação (229,2>166,1) da molécula de MG-H1.

(C) Intensidade das transições. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS) e massa (relação Q1/Q3), respectivamente.

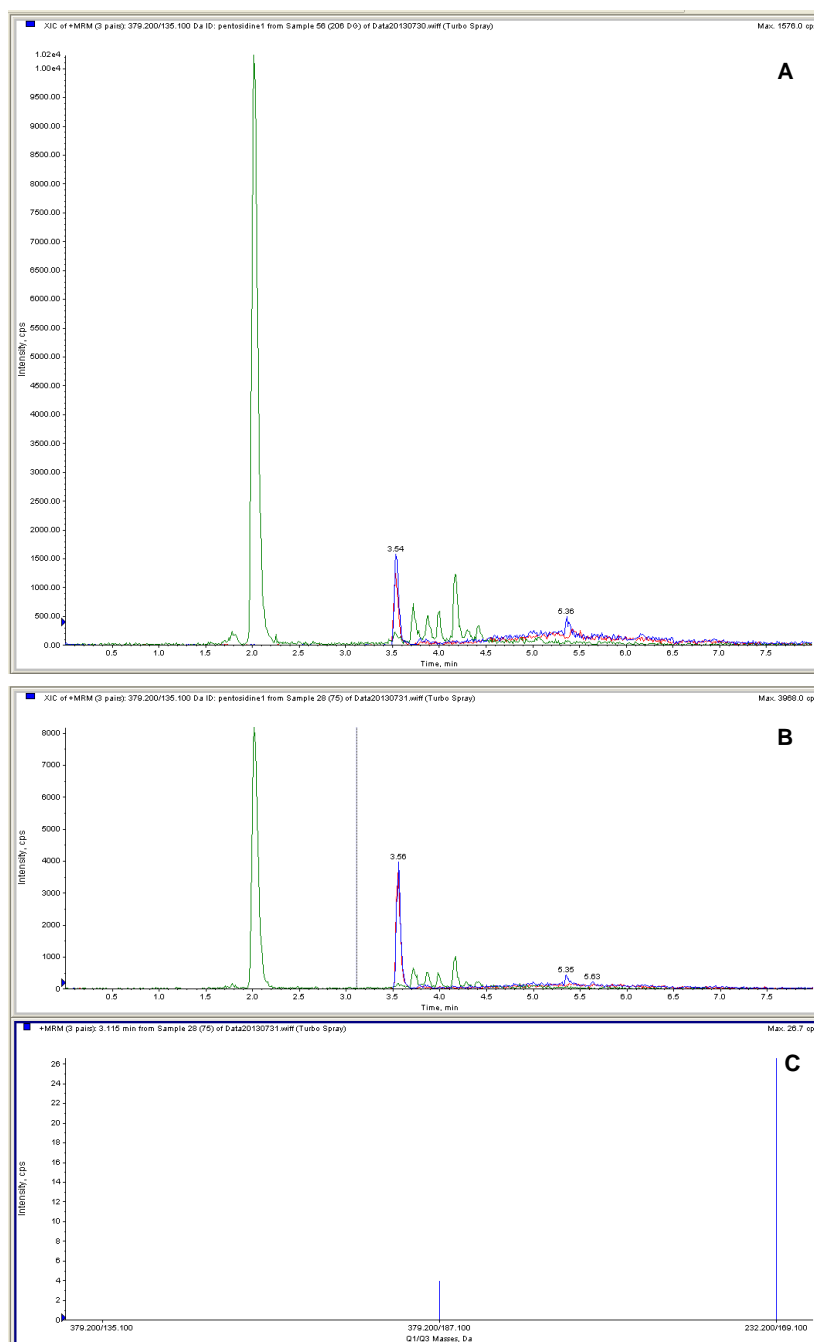


FIGURA 29- PERFIL DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PENTOSIDINA POR LC-MS/MS.

Espectros de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Em verde o padrão interno (MG-H1), em azul a transição de quantificação e em vermelho a transição de confirmação.

(A) Espectro de massa da molécula de pentosidina com tempo de retenção da amostra de 3,56 minutos. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS, contagens por segundo) e tempo do ensaio (minutos), respectivamente.

(B) Maximização do espectro A para detalhamento das transições de reação através do monitoramento de reação múltipla (MRM) para a transição de confirmação (379,2>187,1), para o padrão interno (232,2>169,1) e para a transição de quantificação (379,2>135,1) da molécula de pentosidina.

(C) Intensidade das transições. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS) e massa (relação Q1/Q3), respectivamente.

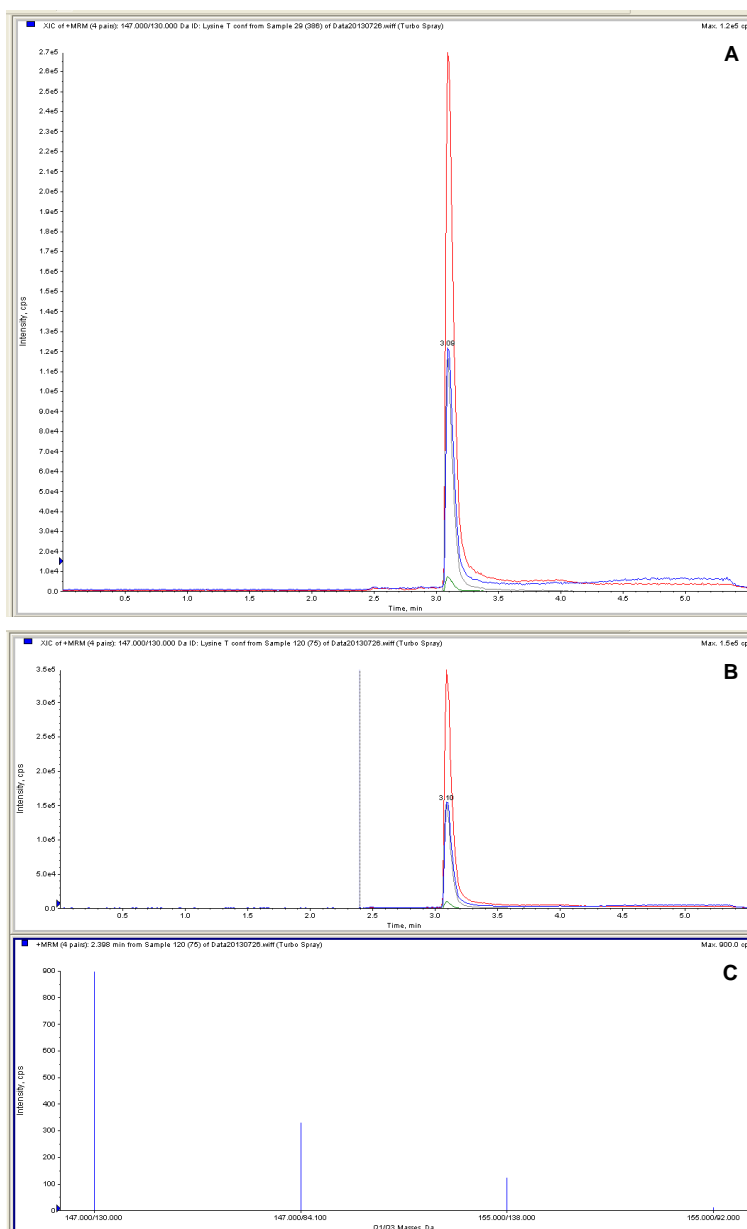


FIGURA 30- PERFIL DE CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LISINA POR LC-MS/MS.

Espectros de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Em verde o padrão interno (Lisina), em azul a transição de quantificação e em vermelho a transição de confirmação.

(A) Espectro de massa da molécula de Lisina com tempo de retenção da amostra de 3,10 minutos. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS, contagens por segundo) e tempo do ensaio (minutos), respectivamente.

(B) Maximização do espectro A para detalhamento das transições de reação através do monitoramento de reação múltipla (MRM) para a transição de confirmação (147,0>130,0), transição de quantificação (147,0>84,1) para a molécula de lisina e para o padrão interno de lisina, as transições de confirmação (155,0>138,0) e de quantificação (155,0>92,0).

(C) Intensidade das transições. Os eixos Y e X representam a intensidade (CPS) e massa (relação Q1/Q3), respectivamente.

A análise dos perfis de LC-MS/MS obtidos, mostra uma boa separação dos compostos de interesse, com baixo ruído de fundo, boa intensidade de sinal e sem a presença de interferentes nas análises (Figuras 28-31).

A comparação entre as concentrações (média/mediana) das moléculas, obtidas nos grupos analisados está apresentada na tabela 22.

TABELA 22- CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) NOS GRUPOS ANALISADOS.

Parâmetros	Controle (n=158)	DMG (n=155)	P
CML/Lisina (mmol/mol)	0,15 (0,14-0,17)	0,17 (0,14-0,24)	<0,001
MG-H1/Lisina (mmol/mol)	2,12±0,34	2,15±0,53	0,544
Pentosidina/Lisina (μmol/mol)	3,68 (2,62-5,20)	4,32 (2,90-5,98)	0,023

CML, carboximetilisina; MG-H1, metilglioxal derivado hidroimidazolona 1. Concentrações séricas dos parâmetros normalizadas pela concentração de lisina.

Os resultados são apresentados como: Média ±1-DP (distribuição normal) e Mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) para variáveis sem distribuição normal. P, probabilidade com o teste t (variáveis independentes) ou *Mann Whitney.

As concentrações séricas de CML/Lisina e Pentosidina/Lisina foram significativamente maiores ($P<0,05$) no grupo DMG em relação ao controle saudável. A molécula de MG-H1 foi a única que apresentou distribuição normal e concentração similar ($P=0,544$) entre os grupos.

Quando comparamos as concentrações obtidas com as disponíveis na literatura encontramos algumas dificuldades. A primeira delas deve-se a ausência de uma metodologia padrão/referência para a dosagem destas biomoléculas, o que torna extremamente difícil o estudo de comparação entre as populações. A segunda dificuldade deve-se à ausência de uma unidade de medida padrão para a expressão dos resultados obtidos. A terceira dificuldade refere-se a ausência de dados para outras populações de gestantes com DMG e saudáveis. Há na literatura muito mais dados disponíveis em populações de diabéticos tipos 1 e 2.

Schiel e colaboradores (2003) mostraram que concentrações de AGEs (CML e pentosidina) são tipicamente mais baixas em indivíduos que apresentam um bom controle glicêmico (SCHIEL *et al.*, 2003). Entretanto naqueles indivíduos que já apresentam complicações, a melhora no controle glicêmico sozinha pode não ser

suficiente para prevenir a progressão destes processos patológicos, que devem-se à formação irreversível de AGEs bem como aos mecanismos pobres ou dificultados de *clearance* renal.

Os dados descritos por Schiel e colaboradores (2003) podem explicar as diferenças não tão expressivas encontradas entre as gestantes com DMG e as gestantes controles (Tabela 16). Como descrito no item 6.2.1 Marcadores de controle glicêmico, os parâmetros avaliados no grupo DMG indicam que estas pacientes possuem um bom controle glicêmico, consequentemente as concentrações de AGEs tendem a ser mais baixas. Devido à hiperglicemia presente nestas pacientes a formação dos AGEs é mais acelerada do que na população de gestantes sem diabetes, entretanto a intervenção na dieta e o uso de insulina quando necessário, promovem melhora no controle glicêmico. Outro fato deve ser analisado, o DMG ocorre durante a gestação, manifestando-se normalmente entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, tornando-se uma doença de curta duração o que torna a pré-existência de complicações associadas ao diabetes mais difícil.

Os AGEs são eliminados principalmente via renal (MIYATA *et al.*, 1998) desta forma os rins contribuem de maneira significativa para as concentrações de AGEs circulantes. Na presença de insuficiência renal, observa-se um aumento nas concentrações dos AGEs porque a eliminação destas moléculas torna-se mais lenta e dificultosa. Na amostra estudada, verifica-se a ausência de insuficiência renal (valores de ureia e creatinina normais, dentro dos parâmetros de referência), logo a concentração dos AGEs não esteve sujeita a alterações decorrentes de problemas renais.

Na literatura estão disponíveis apenas três estudos avaliando o efeito dos AGEs em gestante com diabetes gestacional. O primeiro deles de Buongiorno e colaboradores (1997) analisou a concentração de AGEs em uma população de gestantes com DM1, DM2 e DMG, utilizando a metodologia de ELISA (BUONGIORNO *et al.*, 1997). Foi observado um aumento na concentração dos AGEs ao longo da gestação (do 1º para o 3º trimestre) em gestantes com DM1 e DM2, entretanto esta diferença não foi significativa. Nas gestantes com DMG, a concentração dos AGEs séricos foi maior quando comparada ao grupo controle, possivelmente associado a um mau controle glicêmico. Nossos achados são similares aos descritos por Buongiorno e colaboradores, de maneira geral, uma vez

que as concentrações séricas dos AGEs analisados foram superiores nas gestantes DMG. Entretanto, nossas gestantes não apresentaram mau controle glicêmico.

O segundo estudo, de Harsem e colaboradores (2008), demonstrou concentração de AGEs elevada em gestantes com DM1 e DMG e evidências de aumento no estresse oxidativo somente para as gestantes com DM1. A metodologia empregada neste estudo foi ELISA. Nossos achados também estão em acordo com os de Harsem e colaboradores e da mesma maneira que nossas pacientes apresentaram bom controle glicêmico (HbA1C=5,6%), as pacientes deste estudo tiveram média de HbA1C de 5,9%. Interessante notar que neste mesmo estudo, concentrações de CML estavam diminuídas em gestantes com DMG (HARSEM *et al.*, 2008). Este achado está em desacordo com os dados obtidos por nosso grupo, pois verificamos diferença estatística significativa entre os grupos DMG e controle para a molécula de CML ($p < 0,001$). Diferenças populacionais podem ajudar a explicar esta diferença (população norueguesa vs população sul brasileira).

O terceiro estudo avaliando os níveis séricos de AGEs em DMG, também detectou níveis séricos elevados em gestantes com DMG (GUOSHENG *et al.*, 2009). Interessante que este estudo identificou que concentrações elevadas de AGEs podem ser um indicador de efeitos perinatais adversos em gestantes com DMG (asfixia ao nascimento; malformações congênitas; natimorto) quando os níveis de AGEs permanecem elevados entre meados e fim da gestação. Nossos achados estão em concordância com os achados de Guosheng e colaboradores.

Em um estudo realizado em parceria com o grupo francês do Prof. Dr. Philippe Gillery, no período de doutorado sanduíche, a concentração sérica de pentosidina prediz, de maneira independente, a severidade da aterosclerose coronária em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) (dados submetidos para publicação).

Embora existam indícios de associação entre os AGEs e complicações materno-fetais importantes, há uma carência de estudos disponíveis na literatura de AGEs específicos como realizado neste trabalho. Isto, em associação com a metodologia de LC-MS/MS empregada, extremamente sensível e específica, destaca a importância dos resultados encontrados e das análises realizadas. A análise destas moléculas em uma população maior seria interessante.

5.5 ANÁLISES MOLECULARES

5.5.1 Detecção do polimorfismo A3243G do mtDNA

A figura 31 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para o fragmento contendo o polimorfismo A3243G do mtDNA.

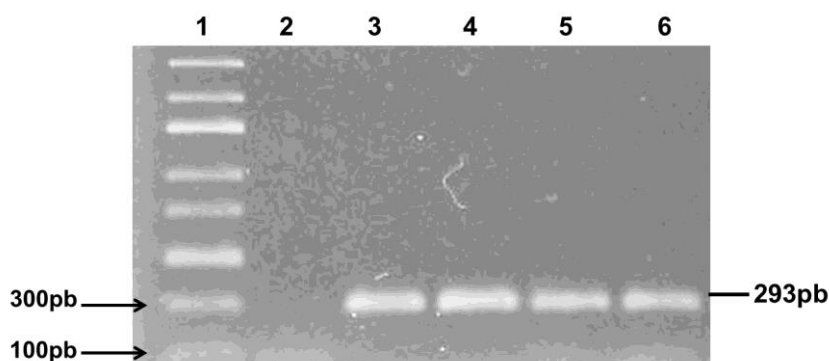


FIGURA 31- PERFIL ELETROFORÉTICO DE PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO CONTENDO O POLIMORFISMO A3243G DO mtDNA.

Na coluna 1 está o marcador de massa (100 pb); na coluna 2 está o controle (branco da reação) e nas colunas 3 a 6 estão amostras amplificadas. À direita do gel está a massa molecular dos fragmentos (293pb) e à esquerda as massas moleculares do marcador de massa.

A figura 32 mostra o perfil eletroforético típico obtido da PCR-RFLP para o polimorfismo A3243G do mtDNA.

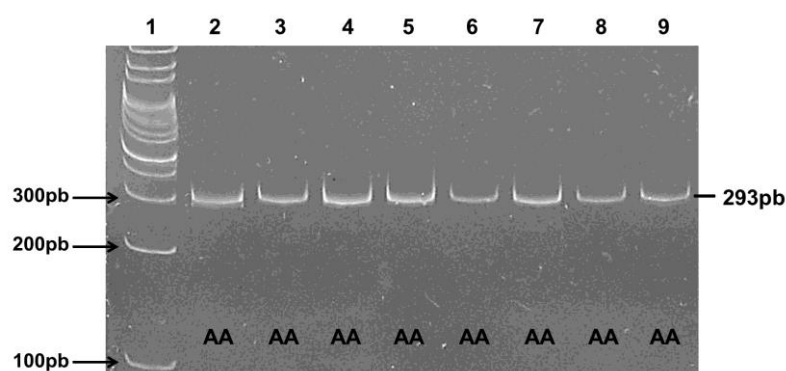


FIGURA 32- PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE PCR-RFLP (293PB) DO FRAGMENTO DO DNA MITOCONDRIAL COM A ENZIMA *ApaI*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados à luz ultravioleta (302nm) com imagem capturada em sistema Biochemi (UVP). Na coluna 1 está o marcador de massa molecular de 100pb. As colunas 2-9 mostram os perfis de restrição para o genótipo A3243A. À direita do gel a massa molecular dos fragmentos obtidos e à esquerda está a massa molecular do marcador de massa.

A figura 33, na sequência, apresenta a sequência do fragmento do mtDNA amplificado e o sítio de restrição da enzima *ApaI* empregada nos ensaios de PCR-RFLP.

SEM O POLIMORFISMO A3243G

```
CTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCACTTTCACAAAGCGCCTTCCCCCG
TAAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTA
AGATGGCAGAGGCCGGTAATCGCATAAACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATT
CCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACTACGCAAA
GGCCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAACCCTTCGCTGACGCCATAAAA
CTCTTCACCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATCACCTCTACATCACCGC
CCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCT
```

COM O POLIMORFISMO A3243G

```
CTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGCCACTTTCACAAAGCGCCTTCCCCCG
TAAATGATATCATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTA
AGATGGCAGGGGCCGGTAATCGCATAAACTTAAACTTTACAGTCAGAGGTTCAATT
CCTCTTCTTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTAATC
GCAATGGCATTCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATATACAACTACGCAAA
GGCCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAACCCTTCGCTGACGCCATAAAA
CTCTTCACCAAAGAGCCCCTAAAACCCGCCACATCTACCATCACCTCTACATCACCGC
CCGACCTTAGCTCTCACCATCGCTCTTCT
```

FIGURA 33- SEQUÊNCIA DE BASES DA REGIÃO DO POLIMORFISMO A3243G AMPLIFICADA (293pb) E O SÍTIO DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA *ApaI*.

Em cor laranja estão os oligonucleotídeos iniciadores empregados para a amplificação do produto de 293pb. Sublinhado na figura está o sítio de restrição da enzima *ApaI* (GGGCC). A seta vermelha indica o ponto exato em que há o corte da enzima. Em azul, negrito e fonte aumentada está o sítio da substituição de base (A>G) na posição 3243.

Como evidenciado na Figura 34 podemos concluir que na ausência do polimorfismo (presença do alelo A na sequência), a enzima de restrição não corta o fragmento em questão. Quando o polimorfismo está presente (presença do alelo G na sequência), a enzima de restrição corta o fragmento de 293 pares de bases em dois fragmentos menores de 117 e 176 pares de bases.

Em todas as amostras analisadas não foi encontrado nenhum paciente apresentando o polimorfismo A3243G do mtDNA. Todos apresentaram o genótipo usual (A3243A) como apresentado na Tabela 23.

TABELA 23- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO A3243G DO mtDNA, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
A3243G				-
A>G mtDNA	A/A	506 (100)	308 (100)	
	A/G	0 (0)	0 (0)	
	G/G	0 (0)	0 (0)	
G frequência alélica				
	H- W (P)	-	-	-
	[95% IC]	-	-	(χ^2) -

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

O estabelecimento das condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) proposta neste estudo permitiu a obtenção de produtos de PCR com boa quantidade e com ausência de bandas inespecíficas (Figura 32, item 5.4.1 Detecção do polimorfismo A3243G do mtDNA).

A genotipagem através da técnica de PCR-RFLP permitiu a identificação dos genótipos do polimorfismo estudado. Nenhuma das amostras testadas apresentou problemas de genotipagem. Como desvantagem para esta técnica deve-se ressaltar que é um processo trabalhoso com múltiplas etapas.

A figura 33 apresentou o perfil de restrição obtido para as amostras em análise. Não foi encontrada nenhuma amostra com a presença da variante A3243G na população estudada, todas as amostras tiveram o perfil usual A3243A.

A mutação A3243G no mtDNA foi descrita pela primeira vez em pacientes com a síndrome de herança materna de encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios do tipo AVC (síndrome de MELAS) (GOTO; NONAKA e HORAI, 1990). A variante está descrita na literatura associada a defeitos na secreção da insulina (ALLAN *et al.*, 1997). A mutação está também associada ao diabetes e surdez nervosa maternalmente herdados (MIDD), resultando em disfunção das células β e secreção prejudicada de insulina (KISHIMOTO *et al.*, 1995). Esta mutação pode portanto estar associada a uma variedade de manifestações de doença (ALLAN *et al.*, 1997), mas é causa mais frequente de diabetes mitocondrial (VAN DEN OUWELAND *et al.*, 1992). A mutação é responsável por

aproximadamente 0,5-2,6% de todos os casos de *diabetes mellitus* (MAASSEN, 2002; MITOMAP, 2008). A prevalência estimada da mutação é de 0,95-16,3 indivíduos por 100.000 (MAJAMAA *et al.*, 1998; CHINNERY *et al.*, 2000).

Diabéticos que apresentem a variação possuem uma inibição progressiva da fosforilação oxidativa que resulta em um aporte de ATP mitocondrial reduzido (ALLAN *et al.*, 1997). Este aporte insuficientes de ATP nas células β pode ser um dos mecanismos patogênicos que levam ao diabetes (FREDERIKSEN *et al.*, 2009).

O reconhecimento do fator de transmissão materno de diabetes tipo 2 (ALCOLADO e ALCOLADO, 1991) levou a uma procura de defeitos mitocondriais no diabetes. A mutação A3243G também estava presente em alguns pacientes com diabetes herdados maternalmente. Pacientes com diabetes gestacional foram avaliados e não se encontraram casos da mutação. Entretanto, em pelo menos um pedigree com diabetes mitocondrial, o diabetes gestacional foi a primeira manifestação da doença (ALCOLADO *et al.*, 1994).

A mutação A3243G foi detectada em 1 de 12 (8,3%) japonesas com DMG (YANAGISAWA *et al.*, 1995) e em 2 de 84 (2,4%) tailandeses com diabetes tipo 1 (CHUANG *et al.*, 1996).

Chen e colaboradores (2000) não detectaram a variante na amostra de Cingapura estudada (CHEN *et al.*, 2000). Da mesma forma, Allan e colaboradores (1997) não encontraram a variante na população americana avaliada. Aggarwal e colaboradores (2000) também não conseguiram detectar a variante em nenhuma das amostras do Reino Unido analisadas (AGGARWAL *et al.*, 2001). Todos estes dados estão em concordância com os obtidos em nosso estudo para a população sul-Brasileira. Este dado pode sugerir que a mutação é uma causa menos frequente ou que não é um componente de risco genético para DMG. A etnia pode ser um fator bastante importante e determinante para a diferença encontrada entre as populações japonesas e tailandesas e as demais, descritas na literatura e neste trabalho.

Um aspecto importante a ser mencionado em relação ao DNA mitocondrial é a presença da hetero e homoplasmia (descrito no item de revisão bibliográfica). Como o DNA mitocondrial é composto por múltiplas cópias, a mutação pode se apresentar em hetero ou homoplasmia no genoma mitocondrial. Neste estudo não foi possível avaliar a hetero e homoplasmia.

Para a população em estudo, nossos dados sugerem baixa relevância desta variação, não sendo sua genotipagem recomendada para estudos populacionais.

5.5.2 Detecção do polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A*

O anexo 6 mostra os resultados obtidos na reação de PCR em tempo real para o gene *ADRA2*. Os dados foram obtidos a partir do software de análise que acompanha o equipamento.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 24.

TABELA 24- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE *ADRA2A*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
(rs10885122)				0,660
G>T <i>ADRA2A</i>	G/G	329 (65,0)	195 (63,0)	
	G/T	153 (30,3)	94 (30,8)	
	T/T	24 (4,7)	19 (6,2)	
T frequência alélica				
	H- W (P) [95% IC]	0,259 20 [17-22]	0,100 21 [18-25]	(χ^2) 0,447

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

Não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para o polimorfismo em questão.

A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica ($p=0,660$) ou alélica ($p=0,447$) entre os grupos estudados.

A tabela 25 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs10885122 em outros estudos e populações.

TABELA 25- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE *ADRA2A* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			GG	GT	TT	T
Euro-Brasileiros	DMG	308	63,02	30,78	6,20	21
	Gestantes saudáveis	506	65,02	30,24	4,74	20
Whitehall II Study (WHII), População de Londres, 2011	DM2	371	78,1	21,1	0,8	11
	Sem diabetes	4864	77,4	21,2	1,3	12
(TALMUD <i>et al.</i> , 2011)						
British Women's Health and Heart Study (BWHHS), 100% mulheres de 23 cidades Inglesas, 2011	Mulheres com DM2	338	83	15	2	9
	Mulheres sem diabetes	3072	76	23	2	13
(TALMUD <i>et al.</i> , 2011)						
English Longitudinal Study of Aging (ELSA), Inglaterra, 2011	DM2	439	73,2	26,4	0,5	14
	Sem diabetes	5091	76,8	21,7	1,5	12
(TALMUD <i>et al.</i> , 2011)						
Northwick Park Heart Study II (NPHSII), 100% homens brancos europeus, 2011	Homens com DM2	159	73,6	24,5	1,9	14
	Homens sem diabetes	2536	77	21,5	1,5	12
(TALMUD <i>et al.</i> , 2011)						
Chineses	DM2	424				7
	Controles saudáveis	1908				8
(CHEN <i>et al.</i> , 2013)						
Chineses	Chineses	180				8
HapMap-CHB						
The United Kingdom Asian Diabetes Study, UKADS (REES <i>et al.</i> , 2011)	DM2					22
	Controles saudáveis					21
Paquistaneses, The Diabetes Genetics in Pakistan study, DGP (REES <i>et al.</i> , 2011)	DM2					23
	Controles saudáveis					25
Japoneses	DM2					9
	Controles saudáveis					9
(FUJITA <i>et al.</i> , 2012)						
Japoneses	Japoneses	100				7
HapMap-JPT						

Em negrito e na primeira linha estão os resultados obtidos nesta pesquisa (gestantes sul-Brasileiras).

As frequências do alelo menos frequente (T) nos trabalhos disponíveis na literatura para populações de origem europeia são similares, variando de 9 a 14% para os diabéticos tipo 2 e controles saudáveis. Para populações de origem asiática variam de 9- 25% para os diabéticos tipo 2 e controles saudáveis.

Nossos dados são similares apenas às frequências obtidas no estudo UKADS e à paquistaneses, com os demais grupos populacionais as frequências obtidas para as gestantes tanto do grupo controle quanto do grupo DMG foram superiores (17-25% IC 95%). A diferença populacional pode ser um dos fatores que justificam a diferença encontrada. Japoneses e chineses apresentam frequência do alelo T cerca de duas vezes inferiores às descritas na literatura de maneira geral. Outros trabalhos também relatam este dado (HU *et al.*, 2010).

A variante em questão, parece não contribuir substancialmente para a susceptibilidade ao DM2 em uma meta análise de sete artigos disponíveis na literatura (CHEN *et al.*, 2013). Em outro estudo uma associação entre variantes do gene *ADRA2A* e o diabetes tipo 2 foi descrita, sugerindo inclusive o gene como um potencial alvo terapêutico (TALMUD *et al.*, 2011).

Nossos estudos mostram que a variante analisada no gene *ADRA2A*, não está associada ao diabetes gestacional em sul-Brasileiras. Dados para comparação com outras populações de gestantes com diabetes gestacional não estão disponíveis na literatura.

As variáveis com correlação significativa para o polimorfismo rs10885122 estão apresentadas na Tabela 26.

TABELA 26- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO *ADRA2A* NA AMOSTRA TOTAL E SEPARADOS POR GRUPOS.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>ADRA2A</i>					
	Amostra total	814	Colesterol total	-0,097	0,007
			LDL-C	-0,103	0,004
			Colesterol não HDL-C	-0,087	0,015
			CML/Lisina	0,179	0,003
	Controle	506	Proteína total	0,131	0,003
			Albumina	0,111	0,013
	DMG	308	IMC	0,161	0,007
			Colesterol total	-0,205	0,001
			HDL-C	-0,164	0,006
			LDL-C	-0,191	0,001
			Colesterol não HDL-C	-0,168	0,005
			CML/Lisina	0,226	0,005
			Jejum TOTG	0,179	0,004
			2h Pós prandial	0,134	0,034
			HbA1C	0,124	0,050

Polimorfismos (*ADRA2A*) códigos: 1= GG e 2= GT+TT

r, coeficiente de correlação. Variáveis analisadas: idade, semana de gestação ou de diagnóstico (controles, diabéticas respectivamente), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), glicemia 2 horas pós-prandial (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (*KCNQ1*, *PPARG*, *SLC2A2*, *ABCC8*).

Códigos para os polimorfismos: 1= homozigoto comum, 2= heterozigoto + homozigoto raro

Na análise de correlação do gene *ADRA2A* com os parâmetros antropométricos e bioquímicos, para a amostra total, uma correlação positiva da variante rs10885122 com a relação CML/Lisina ($r=0,179$, $P=0,003$) foi encontrada. A mesma correlação foi obtida para o grupo DMG ($r=0,226$, $P=0,005$). Na presença do alelo T há um aumento na concentração da carboximetilisina como observado na figura 34.

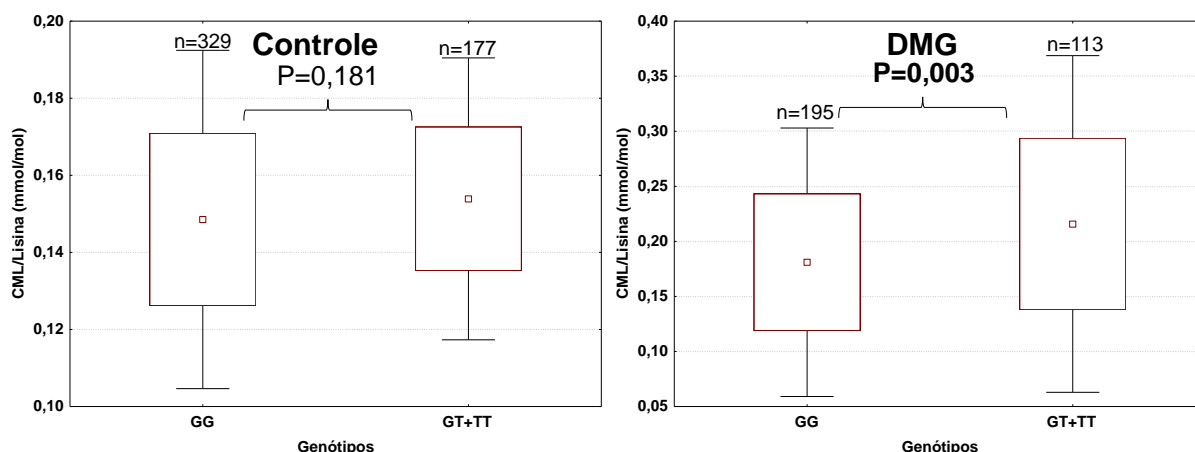


FIGURA 34- ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARBOXIMETILISINA/LISINA E OS GENÓTIPOS DA VARIANTE rs10885122 DO GENE *ADRA2A* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Os dados são apresentados em média (símbolo central), 1-DP (quadrado grande) e 2-DP (barras verticais).

Os genótipos foram agrupados em GG e portadores do alelo T (GT+TT). As comparações foram realizadas com o teste t de Student.

Não estão disponíveis na literatura dados obtidos com outras populações para comparação. Entretanto, como o aumento significativo ($P=0,003$) na concentração da CML foi observado na presença do alelo T no grupo DMG, atribui-se o fato à presença de concentrações glicêmicas mais elevadas neste grupo de pacientes quando comparado à gestantes saudáveis. A presença de CML em concentrações mais elevadas em pacientes diabéticos é esperada, uma vez que a hiperglicemia favorece a sua formação. Estes pacientes estão mais sujeitos às consequências provocadas pelos AGEs.

Nossa hipótese para explicar esta associação é de que variantes no gene *ADRA2A* modificam o mecanismo de ativação da adenilato ciclase e consequentemente a liberação da insulina (mecanismo explicado no item de revisão bibliográfica). Uma vez que isto acontece, a concentração de glucose tende a permanecer elevada na corrente sanguínea favorecendo assim a formação dos AGEs, entre eles a carboximetilisina. O fato de não ter sido observada associação significativa em gestantes saudáveis pode ser em função da glicemia que não se apresenta elevada neste grupo de pacientes e não favorece a formação dos produtos de glicação avançada dentre eles a CML.

Quando analisados os grupos de maneira individual, uma correlação positiva da variante com a proteína total e a albumina no grupo controle e com o IMC,

glicemia de jejum do TOTG, glicemia 2h pós prandial e HbA1C no grupo DMG foi observada.

Quando o IMC foi comparado com os genótipos da variante rs10885122 no grupo DMG, foi observado um aumento deste na presença do alelo T. No grupo controle não houve diferença significativa na presença do alelo, entretanto no grupo DMG a presença do alelo indica maior índice de massa corpórea nestas pacientes (Figura 35).

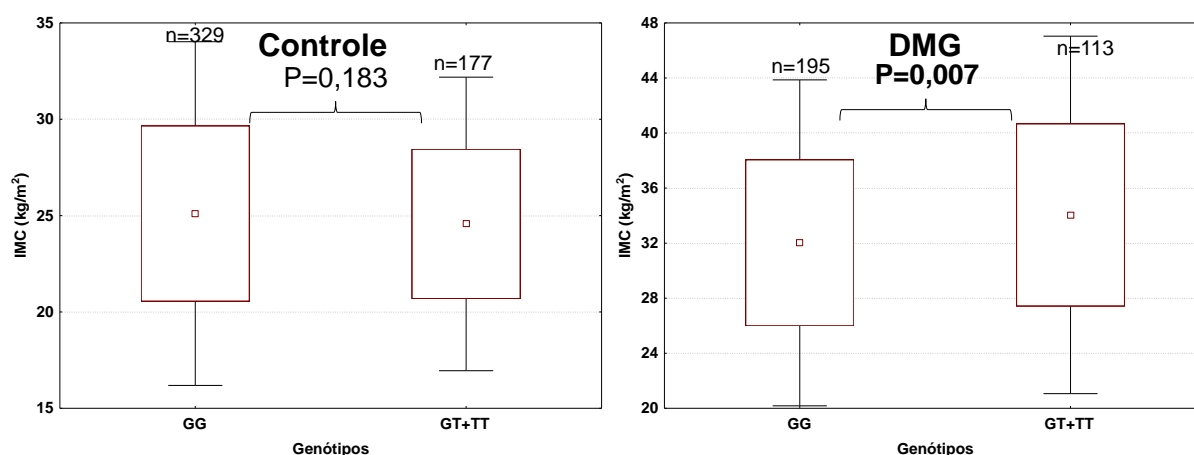


FIGURA 35- ASSOCIAÇÃO ENTRE O IMC E OS GENÓTIPOS DA VARIANTE rs10885122 DO GENE ADRA2A NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Os dados são apresentados em média (símbolo central), 1-DP (quadrado grande) e 2-DP (barras verticais).

Os genótipos foram agrupados em GG e portadores do alelo T (GT+TT). As comparações foram realizadas com o teste t de Student.

Outra variante (rs36022820) do gene *ADRA2A* foi associada ao aumento no IMC (incremento de 0,58 kg/m²) em indivíduos com DM2 (TALMUD *et al.*, 2011). Em nossas análises um incremento de 2,03kg/m² foi observado em diabéticas portadoras do alelo T comparados àquelas portadoras do alelo G da variante rs10885122. Em gestantes com DMG este é o primeiro trabalho a descrever esta associação.

A correlação positiva com marcadores de controle glicêmico no grupo DMG permite inferir que pacientes com mau controle glicêmico apresentam o alelo T ou que a presença do alelo T está relacionada ao mau controle glicêmico. Correlações negativas foram observadas entre a variante e o colesterol total, HDL-C, LDL-C, e Colesterol não-HDL no grupo DMG.

O estudo MAGIC também identificou correlação positiva da variante com a glicemia de jejum (DUPUIS *et al.*, 2010). Talmud e colaboradores (2011) falharam em encontrar esta correlação (TALMUD *et al.*, 2011).

5.5.3 Detecção do polimorfismo rs2237892 do gene *KCNQ1*

O anexo 7 mostra os resultados obtidos na reação de PCR em tempo real para o gene *KCNQ1*. Os dados foram obtidos a partir do software de análise que acompanha o equipamento.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 27.

TABELA 27- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2237892 DO GENE *KCNQ1*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
(rs2237892)				0,613
C>T <i>KCNQ1</i>	C/C	408 (80,6)	256 (83,4)	
	C/T	89 (17,6)	46 (14,9)	
	T/T	9 (1,8)	5 (1,7)	
T frequência alélica	H- W (P)	0,116	0,092	(χ ²) 0,390
	[95% IC]	11 [9-12]	9 [7-12]	

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ²)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ²

Não houve diferença estatística significativa das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para o polimorfismo do gene *KCNQ1* analisado. A frequência genotípica do polimorfismo está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

A tabela 28 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs2237892 em outros estudos e populações.

TABELA 28- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2237892 DO GENE *KCNQ1* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CT	TT	T
Euro-Brasileiros	DMG	308	83,39	14,94	1,67	9
	Gestantes saudáveis	506	80,63	17,59	1,78	11
Europeus	Residentes de Utah com ascendência do Norte da Europa Ocidental					8
HapMap-CEU						
Chineses, 2009	DMG	253	48,7	43,7	7,7	29,5
	Gestantes saudáveis	418	45,6	44,1	10,3	32,3
(ZHOU <i>et al.</i> , 2009)						
Chineses	Chineses					37
HapMap-CHB						
Coreanos, 2010	DMG	930				34
	Gestantes saudáveis	1424				39
(SHIN <i>et al.</i> , 2010)						
Japoneses	Japoneses	100				36
HapMap-JPT						
Holandeses, 2012	DM2	4620	92	7,7	0,3	4
	Controles	5285	90	9,8	0,1	5
(VAN VLIET-OSTAPTCHOUK <i>et al.</i> , 2012)						
Malaíolos da Malásia, 2011	DM2	234	57,7	33,8	8,5	25
	Controles saudáveis	177	45,7	42,4	11,9	33
(SAIF-ALI <i>et al.</i> , 2011)						
Coreanos, 2010	DMG	869	43,1	45,9	11,0	34
	Controles saudáveis	632	37,8	46,4	15,8	39
(KWAK <i>et al.</i> , 2010)						
Índios asiáticos,	DM2	1290	97,6	2,3	0,1	1
	Controles saudáveis	1019	96,3	3,5	0,1	2
Índios asiáticos residentes nos Estados Unidos	DM2	139	95,7	4,3	0	2
	Controles saudáveis	557	93,9	5,7	0,4	3
(BEEN <i>et al.</i> , 2011)						

Em negrito e na primeira linha estão os resultados obtidos nesta pesquisa (gestantes sul-Brasileiras).

O alelo de risco para a variante rs2237892 do gene *KCNQ1* é o alelo C, descrito na literatura associado ao DM2, DMG e a alguns parâmetros bioquímicos.

Para a população coreana foi verificada uma associação positiva entre o alelo C da variante e o DMG ($p=0,003$) (SHIN *et al.*, 2010). Yasuda e colaboradores (2008) e Unoki e colaboradores (2008) detectaram uma susceptibilidade aumentada

para o diabetes tipo 2 na presença da variante rs2237892. No estudo de Unoki e colaboradores (2008), o alelo de risco da variante foi associado significativamente ao DM2 e os seus resultados foram replicados em populações da Singapura e da Dinamarca (UNOKI *et al.*, 2008). Para a população de malaaios, a associação entre a variante e o DM2 foi positiva (SAIF-ALI *et al.*, 2011). O alelo de risco foi também associado a uma diminuição na função da célula β pancreática e a um aumento nos níveis de glicemia de jejum (TAN *et al.*, 2009).

Para a população de índios asiáticos não se verificou associação entre a variante e o DM2. Dados similares foram reportados para a população caucasóide (FRAYLING, 2007; SCOTT *et al.*, 2007; SLADEK *et al.*, 2007). Nossos achados são similares à estes, em que uma associação da variante com a doença não foi detectada. Interessante notar que quando comparamos nossos dados com os dados obtidos para a população holandesa, também observamos diferenças significativas. Nossos dados foram duas vezes superiores aos relatados para àquela população.

Na população chinesa avaliada, as frequências alélicas foram superiores às detectadas para a nossa população (29,5 vs 9%, respectivamente, para o grupo DMG), entretanto, apesar da grande diferença eles também não encontraram associação da variante com o DMG (ZHOU *et al.*, 2009). Para as demais populações de origem asiática, descritas na tabela acima, a associação da variante com a doença foi encontrada bem como foram obtidas frequências genótípicas e alélicas bastante superiores às reportadas por nosso grupo. A etnia parece ser o fator responsável por esta diferença. Se olharmos especificamente para a população de gestantes com DMG de origem asiática verificamos que a nossa frequência alélica foi cerca de 4 a 5 vezes inferior.

A variante foi descrita associada à segunda fase de secreção de insulina, onde os níveis de secreção de insulina estão reduzidos (JONSSON *et al.*, 2009; MUSSIG *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2009; VAN VLIET-OSTAPTCHOUK *et al.*, 2012). Outra associação interessante descrita na literatura foi com altas concentrações de colesterol e com uma tendência para o aumento nos níveis de LDL-C entre os portadores do mesmo alelo (VAN VLIET-OSTAPTCHOUK *et al.*, 2012). Um relação entre as variantes do gene *KCNQ1*, dentre elas a variante rs2237892, com altos níveis de triglicérides e baixos níveis de HDL-C foi relatada (CHEN, Z. *et al.*, 2010).

Dados para outras populações com DMG não estão disponíveis na literatura. A partir dos dados obtidos foi observado que a variante analisada não está associada ao DMG na população sul-Brasileira.

A tabela 29 apresenta a análise de correlação entre a variante analisada e as variáveis bioquímicas.

TABELA 29- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO *KCNQ1* NA AMOSTRA TOTAL E SEPARADOS POR GRUPOS.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>KCNQ1</i>					
	Amostra total	814	Semana de gestação	-0,074	0,040
			Log TG/HDL-C	-0,083	0,020
	Controle	506	HDL-C	0,089	0,046
			Log TG/HDL-C	-0,095	0,034
	DMG	308	Proteína total	0,134	0,025

Polimorfismos (*KCNQ1*) códigos: 1= CC e 2= CT+TT

r, coeficiente de correlação

Variáveis analisadas: idade, semana de gestação ou de diagnóstico (controles, diabéticas respectivamente), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), glicemia 2 horas pós-prandial (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (*ADRA2A*, *PPAR γ* , *SLC2A2*, *ABCC8*).

Códigos para os polimorfismos: 1= homozigoto comum, 2= heterozigoto + homozigoto raro

Na análise de correlação do gene *KCNQ1* foi observada uma correlação negativa da variante com a semana de gestação e o Log(TG/HDL-C) na amostra total.

No grupo controle uma correlação positiva entre a variante e o HDL-C foi encontrada e uma correlação negativa entre a variante e o Log(TG/HDL-C). Na presença do alelo T há um aumento na concentração do HDL-C.

Um relação entre a variante rs2237892 do gene *KCNQ1* com altos níveis de triglicérides e baixos níveis de HDL-C foi relatada na população chinesa (CHEN *et al.*, 2010). Os dados obtidos por Chen e colaboradores (2010) são diferentes do dados obtidos para a população sul-Brasileira. Visto que a frequência alélica é

bastante diferente entre as populações, como mostrado acima, a diferença no efeito do alelo no perfil lipídico segue a mesma linha.

Na literatura também está descrito um aumento nos níveis de LDL-C e de colesterol total na presença da variante rs2237892 (VAN VLIET-OSTAPTCHOUK *et al.*, 2012). Em nosso estudo não encontramos estas relações.

Para o grupo DMG foi detectada apenas uma correlação positiva com a proteína total. Quando comparados os genótipos com as concentrações de proteína total, não houve diferença significativa e efeito dos alelos em ambos os grupos.

5.5.4 Detecção do polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg*

O anexo 8 mostra os resultados obtidos na reação de PCR em tempo real para o gene *PPARG*. Os dados foram obtidos a partir do software de análise que acompanha o equipamento.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 30.

TABELA 30- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1801282 DO GENE *PPARg*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
(rs1801282)				0,395
C>G PPARg	C/C	408 (80,7)	260 (84,4)	
	C/G	96 (18,9)	47 (15,3)	
	G/G	2 (0,4)	1 (0,3)	
G frequência alélica	H- W (P)	0,142	0,460	(χ ²) 0,191
	[95% IC]	10 [8-12]	8 [6-10]	

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ²)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ²

O genótipo CC= Pro/Pro; CG=Pro/Ala e GG=Ala/Ala.

Não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos. A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

A tabela 31 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs1801282 em outros estudos e populações.

TABELA 31- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1801282 DO GENE *PPAR γ* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CG	GG	G
Euro-Brasileiros	DMG	308	84,38	15,28	0,33	8
	Gestantes saudáveis	506	80,65	18,95	0,40	10
Italianos, 2008	Doença arterial periférica	201	74,1	23,9	2,0	14
	Controles saudáveis	201	86,4	14,9	0,5	8
(CATALANO <i>et al.</i> , 2008)						
Coreanos, 2009	DMG	869	91,7	8,2	0,1	4
	Controles saudáveis	632	89,7	10,0	0,3	5
(CHO <i>et al.</i> , 2009)						
Coreanos, 2013	DMG	94	94,6	5,4	0	2,7
	Controles saudáveis	41	82,9	17,1	0	8,5
(CHON <i>et al.</i> , 2013)						
Dinamarqueses, 2005	DM2	1461	76	22	2	13
	Indivíduos tolerantes à glucose	4986	75	23	2	13,9
(HANSEN <i>et al.</i> , 2005)						
Franceses, 2011	Mulheres (mães) tolerantes à glucose	1708	80	19	1	10,4
(HEUDE <i>et al.</i> , 2011)						
Dinamarqueses caucasianos, 2009	DMG	283	75,8	22,6	1,5	12,8
	Mulheres tolerantes à glucose	2446	75,1	22,7	2,1	13,5
(LAUENBORG <i>et al.</i> , 2009)						
Gregos, 2010	DMG	148	96,6	3,4	0	3
	Controles saudáveis	107	93,46	6,54	0	2
(PAPPA <i>et al.</i> , 2011)						
Sul-Brasileiros, 2007	Indivíduos com IMC entre 16,2 e 42,4kg/m ²	335	84,5	14,0	1,5	9
(MATTEVI; ZEMBRZUSKI e HUTZ, 2007)						
Irlandeses do norte, adolescentes do estudo Young Hearts (YH), 2007 (MEIRHAEGHE <i>et al.</i> , 2007)	YH3	382	76,9	22,1	1,0	12
	YH2000	620	77,0	21,2	1,8	12
Escandinavas, 2004	DMG	400	71,5	27,7	0,8	14,6
	Controles saudáveis	428	74,1	24,5	1,4	13,7
Árabes, 2004	DMG	100	91	9	0	4,5
	Controles saudáveis	122	86,9	12,3	0,8	7
(SHAAT <i>et al.</i> , 2004)						
Turcas, 2005	DMG	62	80,64	19,36	0	19,4
	Controles saudáveis	100	84	16	0	16
(TOK <i>et al.</i> , 2006)						
Chineses, 2010	DMG	55	94,6	5,5	0	3

	Controles saudáveis	173	90,8	9,2	0	5
(CHENG <i>et al.</i> , 2010)						
Chineses	Chineses	180				2
HapMap-CHB						
Japoneses	Japoneses	100				6
HapMap-JPT						
Escandinavas, 2007	DMG	649	73,5	24,8	1,7	14,1
	Controles saudáveis	1232	74,5	24,2	1,3	13,4
(SHAAT <i>et al.</i> , 2007)						

Em negrito e na primeira linha estão os resultados obtidos nesta pesquisa (gestantes sul-Brasileiras).

O polimorfismo rs1801282 promove a substituição do aminoácido prolina (Pro, genótipo CC) pela alanina (Ala, genótipo GG), sendo caracterizada como uma variação funcional.

Estudos disponíveis na literatura avaliaram a variante com o DM2, DMG e alguns parâmetros bioquímicos. Catalano e colaboradores (2008) identificaram associação do alelo G (Ala) com um risco aumentado de doença arterial periférica bem como a níveis mais baixos do receptor solúvel de RAGE.

Na população de gestantes coreanas com DMG, não foi observada nenhuma associação da variante com a doença ($P=0,17$) (CHO *et al.*, 2009). Na população dinamarquesa também não foi observada associação da variante com o DM2 (LAUENBORG *et al.*, 2009).

Mulheres francesas analisadas quanto à variante Pro12Ala, apresentaram IMC mais alto antes da gestação, maior taxa de obesidade pré gestação e menor prevalência de DMG quando carreadoras do genótipo Ala/Ala (GG), visto que nenhuma das mães Ala/Ala desenvolveu diabetes (HEUDE *et al.*, 2011). Mulheres com genótipo Ala/Ala apresentaram uma razão de chance para obesidade antes da gestação de 6,32 em comparação àquelas com genótipo Pro/Pro (CC). A variante não foi associada ao risco aumentado de DMG, com as carreadoras de Ala apresentando 50% menos risco de DMG (HEUDE *et al.*, 2011).

A presença do alelo G (Ala) protege os portadores do desenvolvimento de DM2 por diminuir a atividade do *PPARg*. A diminuição da sua atividade predispõe as pessoas a baixos níveis de tecido adiposo e a baixas acumulações de massa, o que melhora a sensibilidade à ação da insulina (WANG *et al.*, 2013).

No estudo dos adolescentes irlandeses foi sugerido que a variante pode representar um fator de susceptibilidade genética para parto prematuro e que o

nascimento prematuro está associado a doenças metabólicas na vida adulta (MEIRHAEGHE *et al.*, 2007).

Para mulheres com DMG de origem escandinava e árabe, não foi observada associação da variante com a doença (SHAAT *et al.*, 2004). Estes dados corroboram com nossos achados para a população sul-Brasileira, na qual não foi verificada associação da variante com a doença.

As frequências do alelo G obtidas em nossa população foram similares às aquelas reportadas para mulheres francesas tolerantes à glucose (10 vs 10,4%, para CTRL e francesas, respectivamente). Ao comparar a frequência do alelo G obtida para ambos os grupos com os demais dados disponíveis na literatura, observa-se que a nossa frequência (8% para DMG) é intermediária entre as obtidas para chineses, gregos, coreanos e árabes (3, 3, 4 e 4,5%, respectivamente para o grupo DMG); e as obtidas para dinamarquesas, escandinavas e turcas (12,8, 14,6 e 19,4%, respectivamente para o grupo DMG). Diferenças populacionais podem explicar o achado, entretanto, nossos dados apresentam a tendência de serem mais similares aos de populações de origem europeia, uma vez que se bem analisado nossa frequência é 2 vezes superior às frequências das populações asiáticas e do leste europeu.

A frequência do alelo G descrita para indivíduos sul-Brasileiros com IMC entre 16,2 e 42,4kg/m² é similar a encontrada por nosso grupo (9 vs 10%, para o grupo controle) bem como a distribuição genotípica apresenta o mesmo perfil. Este achado confirma nossos dados, visto que ambas as populações apresentam as mesmas características étnicas (sul-Brasileiras).

A tabela 32 apresenta as análises de correlação para o polimorfismo analisado.

TABELA 32- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO *PPARg* NA AMOSTRA TOTAL E SEPARADOS POR GRUPOS.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>PPARg</i>					
	Amostra total	814	Sem correlação positiva	---	---
	Controle	506	IMC	0,177	0,003
	DMG	308	IMC	-0,060	$> 0,05$
			HDL-C	0,118	0,042

Polimorfismos (*PPARg*) códigos: 1= CC e 2= CG+GG

r, coeficiente de correlação

Variáveis analisadas: idade, semana de gestação ou de diagnóstico (controles, diabéticas respectivamente), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), glicemia 2 horas pós-prandial (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (*ADRA2A*, *KCNQ1*, *SLC2A2*, *ABCC8*).

Códigos para os polimorfismos: 1= homozigoto comum, 2= heterozigoto + homozigoto raro

No grupo controle o IMC apresentou correlação positiva ($p=0,003$) e no grupo DMG esta correlação não foi observada ($p>0,05$). A presença do alelo G em gestantes saudáveis tende a aumentar o IMC nestas pacientes como mostra a figura 36.

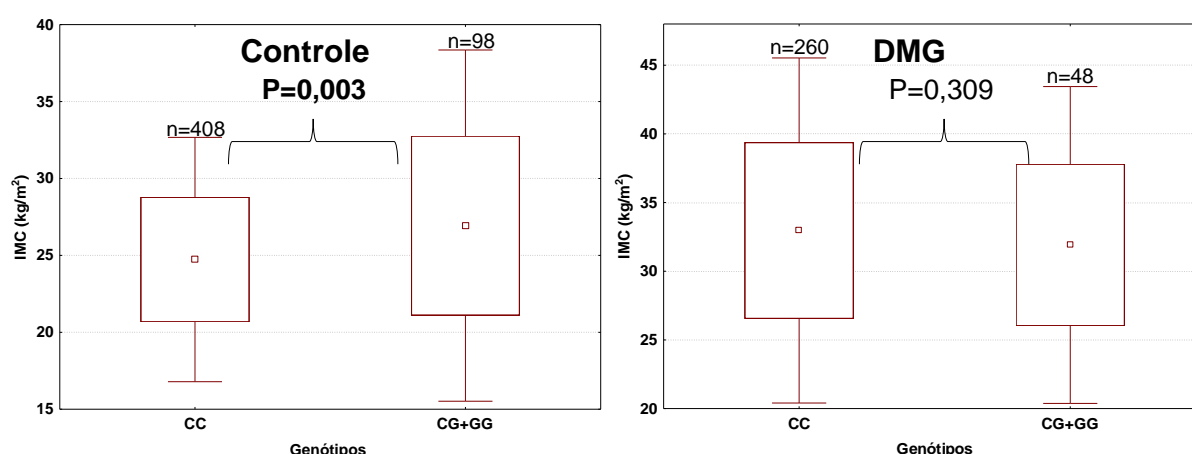


FIGURA 36- ASSOCIAÇÃO ENTRE O IMC E OS GENÓTIPOS DA VARIANTE rs1801282 DO GENE *PPARg* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Os dados são apresentados em média (símbolo central), 1-DP (quadrado grande) e 2-DP (barras verticais).

Os genótipos foram agrupados em CC (Pro/Pro) e portadores do alelo G (Pro/Ala + Ala/Ala). As comparações foram realizadas com o teste t de Student.

No grupo controle, as portadoras do alelo G apresentaram em média um incremento de peso de cerca de 7kg (dados não mostrados) e no IMC de 2,2kg/m².

O gene *PPARg* é considerado um forte candidato para a predisposição à obesidade porque participa na regulação do armazenamento de energia e na homeostase da glucose e lipídios (CHEN *et al.*, 2009).

Stuebe e colaboradores, 2010 reportaram uma associação do alelo de risco da variante com maior ganho de peso gestacional. Portadoras do genótipo Ala/Ala tiveram maior ganho de peso do que àquelas Pro/Pro em uma população caucasoides (STUEBE *et al.*, 2010). Tok e colaboradores (2006) encontraram maior ganho de peso em mulheres portadoras do genótipo Pro12Ala do que naquelas portadoras do genótipo Pro12Pro (TOK *et al.*, 2006). Estes dados reforçam os nossos achados de maior IMC em portadoras do genótipo Ala/Ala. As gestantes do grupo controle apresentam mediana de semana de gestação inferior às gestantes DMG que se encontram em período mais avançado da gestação (14 vs 31, respectivamente para os grupos controle e DMG), ou seja, as gestantes saudáveis ainda terão um ganho de peso fisiológico da gestação importante. Se a correlação for detectada em um período precoce da gestação pode ser um marcador auxiliar de investigação e controle de peso nas gestantes portadoras do genótipo Ala.

A figura 37 mostra a comparação entre os genótipos da variante e o HDL-C. No grupo DMG portadoras do genótipo Ala (Pro/Ala +Ala/Ala) apresentam concentrações séricas mais elevadas de HDL-C do que àquelas portadoras do genótipo Pro/Pro. No grupo de gestantes saudáveis há uma diminuição no HDL-C na presença da alanina, sugerindo que estes pacientes possam apresentar um fator de risco para a doença cardiovascular maior quando comparados aos portadores do alelo C (Pro) em homozigose, entretanto a comparação não foi significativa para este grupo (P=0,302).

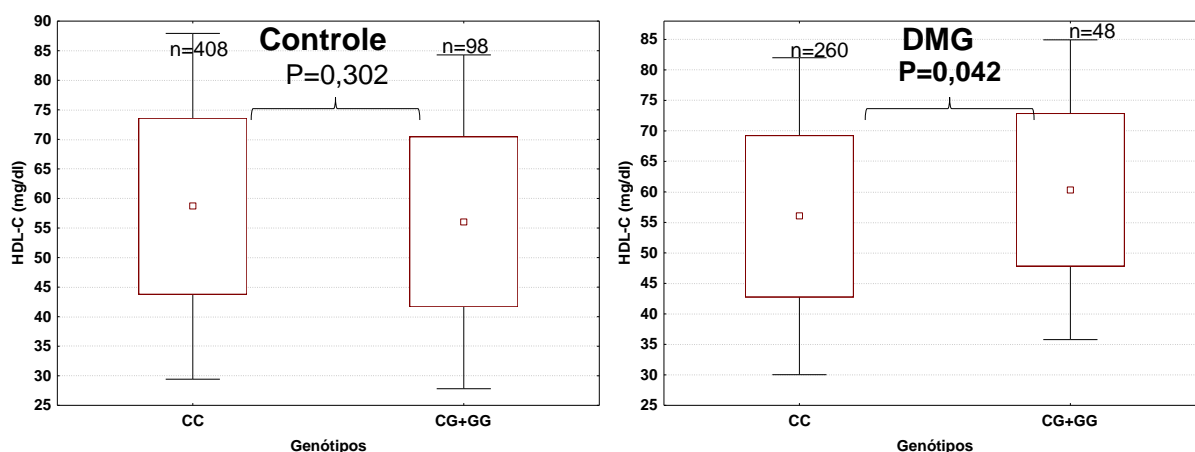


FIGURA 37- ASSOCIAÇÃO ENTRE O HDL-C E OS GENÓTIPOS DA VARIANTE rs10885122 DO GENE *PPAR γ* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Os dados são apresentados em média (símbolo central), 1-DP (quadrado grande) e 2-DP (barras verticais).

Os genótipos foram agrupados em CC (Pro/Pro) e portadores do alelo G (Pro/Ala + Ala/Ala). As comparações foram realizadas com o teste t de Student.

Em nosso estudo não encontramos correlação entre a variante estudada e os demais parâmetros do perfil lipídico. Achados estes em concordância com outros descritos na literatura (CATALANO *et al.*, 2008) e com um estudo realizado em sul-Brasileiros que também não encontrou correlação da variante com o perfil lipídico (MATTEVI; ZEMBRZUSKI e HUTZ, 2007). Este mesmo estudo sul-Brasileiro encontrou correlação positiva entre a variante e o IMC em homens, com estes apresentando maior peso na presença do alelo G (Ala). Interessante notar que este estudo, diferentemente do nosso, não encontrou nenhum efeito do alelo em mulheres.

Ao se tratar de obesidade, os estudos não são consistentes nos achados. Deeb e colaboradores (1998) reportaram uma associação da variante com menor IMC (DEEB *et al.*, 1998). Por outro lado, em um estudo de finlandesas obesas, o genótipo Ala12Ala foi associado a um aumento no IMC, na massa gorda, cintura e quadril quando comparado à mulheres obesas portadoras dos genótipos Pro12Pro e Pro12Ala (VALVE *et al.*, 1999). Este achado é similar ao que encontramos para a população de gestantes.

Uma meta-análise de 30 estudos independentes mostrou que a variante Pro12Ala pode ser um modificador genético da obesidade (MASUD; YE e GROUP, 2003). Discrepâncias entre indivíduos magros e obesos pode indicar uma interação

variável do alelo Ala12 com outros fatores genéticos e/ou ambientais (TOK *et al.*, 2006).

No tecido adiposo subcutâneo de gestantes obesas com diabetes gestacional, a expressão do mRNA do PPAR γ é diminuída em relação às gestantes saudáveis (CATALANO *et al.*, 2002; CAPOBIANCO *et al.*, 2013). A presença do diabetes gestacional está associada a um metabolismo de lipídeos anormal no tecido adiposo, o que pode desempenhar um papel importante na patogênese da doença (LAPPAS, 2014).

Estudos anteriores demonstraram que, ao contrário do PPAR α e PPAR δ , que desempenham um papel relacionado com a oxidação de lípidos, o PPAR γ aumenta a absorção de ácidos graxos livres em trofoblastos humanos em cultura por meio de mecanismos que envolvem o aumento na formação de gotículas de gordura e os transportadores de ácidos graxos (SCHAIFF *et al.*, 2005; BILDIRICI *et al.*, 2003). Deste modo, o PPAR γ aumenta as concentrações de lípidos polares e neutros na placenta de pacientes saudáveis, embora só regule positivamente as concentrações dos fosfolípidos e ésteres de colesterol na placenta de pacientes diabéticos. Isto, juntamente com as concentrações reduzidas de PPAR γ observadas, sugere que PPAR γ não é um mecanismo principal responsável pelo aumento das concentrações de lipídios na placenta de pacientes diabéticos tipo 2 (CAPOBIANCO *et al.*, 2013).

Uma vez que o gene *PPAR γ* está envolvido na regulação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e de glucose, nossa hipótese para explicar as associações observadas entre o alelo G e o IMC e HDL-C, é que a presença da variante no gene altera a sua atividade. Como consequência, diversos processos sofrem alterações, dentre eles a secreção de insulina estimulada pela glucose, a adipogênese e o metabolismo e armazenamento de lipídeos. Estes processos estão fortemente associados ao ganho de peso e metabolismo de HDL-C.

5.5.5 Detecção do polimorfismo rs5393 do gene *SLC2A2*

O anexo 9 mostra os resultados obtidos na reação de PCR em tempo real para o gene *SLC2A2*. Os dados foram obtidos a partir do software de análise que acompanha o equipamento.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 33.

TABELA 33- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs5393 DO GENE *SLC2A2*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
(rs5393)				0,756
A>C SLC2A2	A/A	342 (67,6)	201 (65,1)	
	A/C	146 (28,9)	94 (30,6)	
	C/C	18 (3,5)	13 (4,3)	
G frequência alélica				
	H- W (P) [95% IC]	0,622 18 [16-20]	0,633 19 [16-23]	(χ^2) 0,451

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2

Não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para o polimorfismo do gene *SLC2A2* analisado. A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

A tabela 34 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs5393 em outros estudos e populações.

TABELA 34- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs5393 DO GENE SLC2A2 COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			AA	AC	CC	C
Euro-Brasileiros	DMG	308	65,12	30,56	4,32	19
	Gestantes saudáveis	506	67,59	28,86	3,55	18
Finlandeses, 2007	Intolerantes à glucose	522	71,65	8,24	20,11	11
(KILPELAINEN <i>et al.</i> , 2007)						
Ascendência Mexicana	Ascendência Mexicana em Los Angeles, California	100	62,5	33,3	4,2	20,8
HapMap-MEX						
Italianos	Toscans da Itália	180	72,4	23	4,6	16,1
HapMap-TSI						
Africanos	Africanos do sub-Sahara	100	25	52,7	22,3	48,7
HapMap-YRI						
Japoneses	Japoneses	100				5
HapMap-JPT						
Chineses	Chineses	180				4
HapMap-CHB						

Em negrito e na primeira linha estão os resultados obtidos nesta pesquisa (gestantes sul-Brasileiras).

A variante rs5393 foi associada à prática de atividade física e à conversão de intolerantes à glucose em diabéticos tipo 2 (KILPELAINEN *et al.*, 2007). Uma mudança na prática de atividade física modifica o efeito da variante nos níveis de glucose e na conversão de intolerantes à glucose em DM2, entre indivíduos com intolerância à glucose (KILPELAINEN *et al.*, 2007).

Outro estudo disponível na literatura investigou a variante em indivíduos com IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ e intolerantes à glucose, e verificou que a variante também prediz a conversão dos intolerantes à glucose em diabéticos tipo 2 (LAUKKANEN *et al.*, 2005). Aqueles que apresentam o genótipo AA apresentam três vezes mais risco de desenvolverem DM2 (LAUKKANEN *et al.*, 2005).

Ao compararmos nossos resultados com os de indivíduos intolerantes à glucose, verificamos que as gestantes apresentam frequência superior do alelo menos frequente (19 vs 11%, para DMG sul-Brasileiras e Finlandeses intolerantes à glucose, respectivamente). Esta diferença pode ser em função da população avaliada que apresenta características diferentes.

A frequência do alelo C obtida para a população sul-Brasileira analisada, foi similar àquelas reportadas para ascendentes mexicanos e italianos, provenientes da Toscana (18 vs 20,8 e 16,1%, para CTRL, ascendentes mexicanos e italianos, respectivamente). Da mesma forma que para a população Finlandesa, a origem étnica pode explicar o achado, similar neste caso.

Se compararmos a frequência do alelo C para a população sul-Brasileira com a de Africanos, verificamos uma diferença expressiva (18 vs 48,7%, para CTRL sul-Brasileiros e Africanos, respectivamente). Em se tratando de uma população saudável, o fator determinante para justificar a diferença observada é a etnia, visto que a população sul-Brasileira é predominantemente de Euro-Brasileiros (89,7%). As análises de comparação com populações asiáticas mostraram diferença significativa na frequência do alelo C, apresentando frequência de 3 a 4 vezes menor que a população caucasiana.

A variante rs5393 não foi associada ao diabetes gestacional na população analisada e outros estudos avaliando esta variante no DMG não estão disponíveis na literatura.

A tabela 35 apresenta as análises de correlação entre a variante e os parâmetros antropométricos e clínicos.

TABELA 35- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO *SLC2A2* NA AMOSTRA TOTAL E SEPARADOS POR GRUPOS.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>SLC2A2</i>					
	Amostra total	814	Idade	-0,088	0,014
	Controle	506	Idade	-0,092	0,040
			Albumina	0,100	0,025
	DMG	308	HbA1C	-0,137	0,030
			Ácido úrico	-0,138	0,021

Polimorfismos (*SLC2A2*) códigos: 1= TT e 2= TG+GG

r, coeficiente de correlação

Variáveis analisadas: idade, semana de gestação ou de diagnóstico (controles, diabéticas respectivamente), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), glicemia 2 horas pós-prandial (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (*ADRA2A*, *KCNQ1*, *PPARg*, *ABCC8*).

Códigos para os polimorfismos: 1= homozigoto comum, 2= heterozigoto + homozigoto raro.

A variante do gene *SLC2A2* analisada apresentou correlação negativa com a idade na amostra total. Esta mesma correlação se repetiu no grupo controle e uma correlação positiva foi observada com a albumina. No grupo DMG correlações negativas foram detectadas com a HbA1C e o ácido úrico.

Quando os genótipos foram comparados com os parâmetros mencionados na tabela acima, não foi observada nenhuma associação genótipo-fenótipo significativa ($P > 0,05$).

5.5.6 Detecção do polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8*

O anexo 10 mostra os resultados obtidos na reação de PCR em tempo real para o gene *ABCC8*. Os dados foram obtidos a partir do software de análise que acompanha o equipamento.

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 36.

TABELA 36- FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3758947 DO GENE *ABCC8*, NA AMOSTRA EM ESTUDO.

Polimorfismos		Controle (n= 506)	DMG (n= 308)	P
(rs3758947)				0,131
C>T ABCC8	C/C	306 (60,4)	177 (57,4)	
	C/T	180 (35,5)	109 (35,4)	
	T/T	20 (4,1)	22 (7,2)	
A frequência alélica	H- W (P)	0,306	0,360	(χ ²) 0,150
	[95% IC]	22 [19-24]	25 [21-28]	

Valores dos genótipos são n (%)

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ²)

95% IC: Intervalo de confiança de 95%

P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ²

Não houve diferença estatística significativa para as frequências alélicas e genotípicas entre os grupos para o polimorfismo do gene *ABCC8* analisado. A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos.

A tabela 37 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs3758947 em outros estudos e populações.

TABELA 37- COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3758947 DO GENE *ABCC8* COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	n	Genótipo (%)			Alelo (%)
			CC	CT	TT	T
Euro-Brasileiros	DMG	308	57,36	35,43	7,20	25
	Gestantes saudáveis	506	60,41	35,50	4,08	22
Finlandeses, 2007	Intolerantes à glucose	522	52,11	8,24	39,65	25
(KILPELAINEN <i>et al.</i> , 2007)						
Asiáticos	Chineses Han não relacionados de Beijing	180	58,5	31,7	9,8	25,6
HapMap-CHB						
Europeus	Residentes de Utah com ascendência do Norte da Europa Ocidental	90	68,1	30,1	1,8	16,8
HapMap-CEU						
Ascendência mexicana	Ascendência mexicana em Los Angeles, Califórnia	100	40	50	10	35
HapMapMEX						
Asiáticos	Japoneses de Tóquio	100	55,8	36	8,1	26,2
HapMap-JPT						

Em negrito e na primeira linha estão os resultados obtidos nesta pesquisa (gestantes sul-Brasileiras).

A frequência do alelo T para ambos os grupos analisados, controle e DMG, não foi estatisticamente diferente. A distribuição dos genótipos foi bastante similar em ambos os grupos.

Não foram encontrados na literatura, outros grupos que tenham analisado esta variante em populações de gestantes com DMG. Dados para comparação foram obtidos no HapMap para diferentes grupos étnicos.

Os dados obtidos para a população sul-brasileira são similares àqueles escritos para Finlandeses intolerantes à glucose (KILPELAINEN *et al.*, 2007). A frequência do alelo T para o grupo DMG e o grupo de intolerantes finlandeses é a mesma (25%). Variantes no gene *ABCC8* e *SLC2A2* foram associadas com a conversão de indivíduos intolerantes à glucose em diabéticos tipo 2 no Estudo Finlandês de Prevenção de Diabetes (DPS) (LAUKKANEN *et al.*, 2004; LAUKKANEN *et al.*, 2005). Este fato pode ajudar a explicar a similaridade encontrada entre a gestantes com DMG e os Finlandeses uma vez que a população

avaliada foi de intolerantes à glucose com alteração na glicemia, e que o DM2 e o DMG partilham mecanismos e variações genéticas. No mesmo estudo Finlandês uma redução no risco do desenvolvimento de DM2 associado às variantes nos genes *ABCC8* e *SLC2A2* com intervenções no estilo de vida foi observada, de maneira independente à perda de peso. Este dado indica uma forte interação entre o gene e o ambiente (LAUKKANEN *et al.*, 2004).

Ao comparar os dados obtidos com a população de origem asiática (HapMap-CHB e HapMap- JPT), não foi observada diferença significativa, pelo contrário, os dados são similares aos do grupo controle.

Frequências genotípicas diferentes foram observadas entre a população sul-Brasileira e ascendentes Mexicanos (22 vs 35%, para CTRL sul-Brasileiros e Mexicanos, respectivamente) e entre a população sul-Brasileira e Europeus (22 vs 16,8%, para CTRL sul-Brasileiros e Europeus, respectivamente). Em ambos os casos, vale a pena ressaltar que maiores informações referentes às populações estudadas não estão disponíveis.

A tabela 38 apresenta as análises de correlação entre a variante e os parâmetros antropométricos e bioquímicos da amostra.

TABELA 38- VARIÁVEIS COM CORRELAÇÃO LINEAR (PEARSON) SIGNIFICATIVA ($P < 0,05$) PARA O POLIMORFISMO *ABCC8* NA AMOSTRA TOTAL E SEPARADOS POR GRUPOS.

Gene	Grupos	n	Variáveis com $P < 0,05$	r	P
<i>ABCC8</i>					
	Amostra total	814	Semana de gestação	0,076	0,033
			PAD	-0,073	0,042
			Colesterol total	0,094	0,009
			TG	0,075	0,036
			LDL-C	0,089	0,013
			Colesterol não HDL-C	0,099	0,006
			Colesterol/HDL-C	0,827	0,021
	Controle	506	Sem correlação positiva	---	---
	DMG	308	Colesterol não HDL-C	0,117	0,050
			1,5AG	0,127	0,036

Polimorfismos (*ABCC8*) códigos: 1= GG e 2= GA+AA

r, coeficiente de correlação

Variáveis analisadas: idade, semana de gestação ou de diagnóstico (controles, diabéticas respectivamente), IMC (kg/m^2), glicemia jejum (mg/dL), glicemia 2 horas pós-prandial (mg/dL), colesterol total (mg/dL), HDL-C (mg/dL), LDL-C (mg/dL), triglicérides (mg/dL), colesterol não-HDL (mg/dL), relação colesterol/HDL (Castelli I), relação LDL-C/HDL-C (Castelli II), Log(TG/HDL), variabilidades genéticas (*ADRA2A*, *KCNQ1*, *PPARg*, *SLC2A2*).

Códigos para os polimorfismos: 1= homozigoto comum, 2= heterozigoto + homozigoto raro

Na amostra total, a análise mostrou correlação positiva entre a variante e a semana de gestação, o colesterol total, o TG, o LDL-C, o Colesterol não-HDL e a relação Colesterol/HDL-C. Uma correlação negativa foi vista com a PAD.

No grupo controle nenhuma correlação foi observada.

No grupo DMG correlações positivas entre a variante e o Colesterol não-HDL-C e o 1,5AG foram detectadas. Quando comparados os genótipos e estes parâmetros, foi observado um aumento na concentração sérica de 1,5AG na presença do alelo T (CT+TT) no grupo de gestantes com diabetes gestacional.

Quando as concentrações glicêmicas ultrapassam o limiar renal, ocorre redução da concentração plasmática de 1,5AG por inibição competitiva com a glucose pela reabsorção tubular proximal (DUNGAN, 2008). O 1,5AG responde de maneira rápida e sensível às excursões glicêmicas, refletindo elevações transitórias

da glucose em poucos dias, 24-72 horas (YAMANOUCHI *et al.*, 1992), sendo caracterizado como um marcador do controle glicêmico. As concentrações plasmáticas do 1,5AG variam inversamente à glucose urinária, glicemia de jejum e HbA1C. A observação do aumento da concentração plasmática de 1,5AG no grupo DMG na presença do alelo T, indica uma melhora no controle glicêmico destas pacientes.

A figura 38 apresenta a comparação entre os genótipos e o 1,5AG nos grupos.

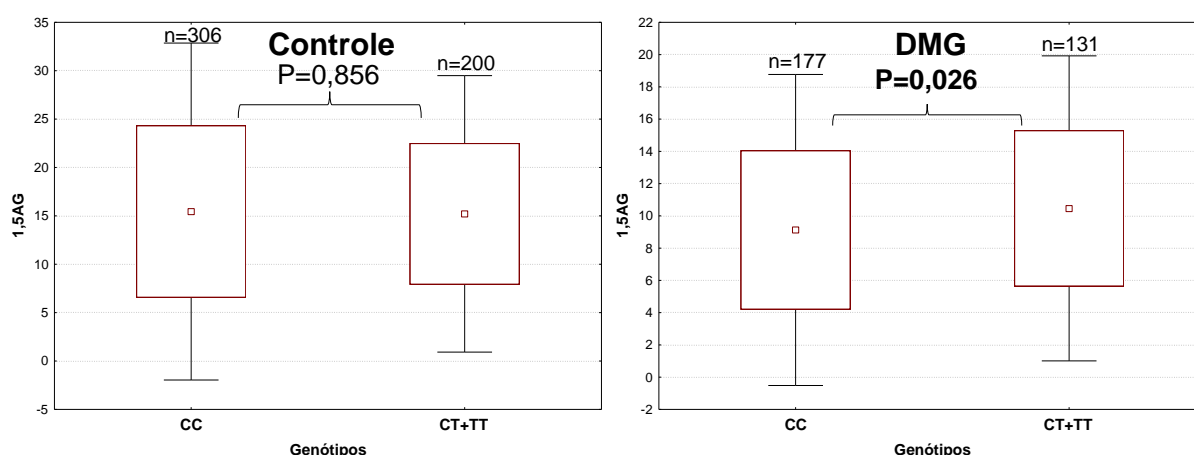


FIGURA 38- ASSOCIAÇÃO ENTRE O 1,5 ANIDROGLUCITOL E OS GENÓTIPOS DA VARIANTE rs3758947 DO GENE ABCC8 NOS GRUPOS EM ESTUDO. Os dados são apresentados em média (símbolo central), 1-DP (quadrado grande) e 2-DP (barras verticais). Os genótipos foram agrupados em CC e portadores do alelo T (CT+TT). As comparações foram realizadas com o teste t de Student.

As análises de associação dos genótipos (CT+TT) frente aos marcadores de controle glicêmico, HbA1C $<6,5\%$ e $\geq 6,5\%$, e 1,5AG $<10\mu\text{g/mL}$ e $\geq 10\mu\text{g/mL}$ não apresentaram significância ($P>0,05$; dados não mostrados). Estes resultados sugerem que os genótipos em estudo, não apresentam associação com o controle glicêmico.

O gene *ABCC8* está associado à secreção de insulina e apresenta forte componente ambiental, uma vez que na presença da variante a redução da conversão de intolerantes à glucose em DM2, com intervenção no estilo de vida, foi descrita pelo grupo Finlandês (KILPELAINEN *et al.*, 2007). A presença do alelo T, em pacientes com mudanças no estilo de vida, pode ser uma vantagem, uma vez que o gene apresenta forte interação com o ambiente. Novos estudos avaliando o

efeito das modificações no estilo de vida com ênfase na dieta e na prática de atividade física, poderão melhor avaliar o efeito deste alelo no diabetes gestacional.

Variações genéticas que levam à perda de função dos canais de potássio ATP dependentes promovem o hiperinsulinismo, ou seja, este canal passa a produzir uma despolarização constante da membrana celular e consequentemente um influxo contínuo de cálcio para dentro da célula. Uma vez que isto acontece, há um estímulo contínuo para a liberação de insulina que promove o hiperinsulinismo. Uma vez que há alta secreção de insulina, há diminuição da concentração de glucose sanguínea (hipoglicemia). Como o 1,5AG e a glucose competem e apresentam concentrações inversamente proporcionais, uma vez que haja diminuição da glucose, há aumento do 1,5AG. Esta é a nossa hipótese para explicar a associação encontrada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diabetes gestacional é uma patologia frequente e de grande impacto tanto para a gestante quanto para o feto. Parte das gestantes permanecem diabéticas após o parto, o que reforça a relevância da detecção, tratamento e orientação da patologia.

Com este estudo de múltiplos polimorfismos pudemos obter um perfil genético da população sul-Brasileira para os genes em estudo, que não são conhecidos, bem como avaliar o impacto destas variantes em nossa população.

Não é possível descartar o efeito do tamanho amostral, relativamente pequeno, nas análises estatísticas. O processo patológico – diabetes – pode alterar o metabolismo e com isto ressaltar ou mesmo suprimir o efeito de SNPs sobre vias metabólicas.

Os produtos de glicação avançada (AGEs) analisados, apresentam potencial para futuras investigações no diabetes gestacional em um tamanho amostral ampliado.

A busca de marcadores de risco e/ou proteção associados ao diabetes gestacional é relevante para ampliar o conhecimento desta patologia de elevada frequência e que aumenta os riscos de futuras comorbidades, para a mãe e para o feto. Marcadores como o Log(TG/HDL-C) com alta sensibilidade e baixo custo operacional, são de grande interesse e podem contribuir de maneira significativa para a detecção precoce do diabetes gestacional.

Análises futuras com maior tamanho amostral e que permitam uma melhor subclassificação da amostra são os objetivos do nosso grupo de pesquisa.

7 CONCLUSÃO

- A variante A3243G do mtDNA não está associada ao *diabetes mellitus* gestacional na população sul-Brasileira avaliada e o fato de não ter sido encontrada nenhuma variante em cerca de 800 pacientes analisados, sugere que este polimorfismo tem pouca ou nenhuma relevância na triagem do DMG em nossa população;
- As variantes rs10885122 do gene *ADRA2A*; rs2237892 do gene *KCNQ1*; rs1801282 do gene *PPARG*; rs5393 do gene *SLC2A2* e rs3758947 do gene *ABCC8* não estão associadas ao *diabetes mellitus* gestacional na população sul-Brasileira avaliada;

- Foi encontrada uma correlação positiva entre a variante rs10885122 do gene *ADRA2A* e os marcadores de controle glicêmico nas gestantes do grupo DMG;

Uma associação entre o IMC e a variante rs10885122 do gene *ADRA2A* foi encontrada nas gestantes com diabetes gestacional. Portadores do alelo T (GT+TT) apresentam um incremento em média de 2,03kg/m² no índice de massa corpórea (IMC), quando comparados aos homozigotos GG. Esta relação não ocorre em gestantes saudáveis;

- Foi encontrada uma correlação positiva da variante rs1801282 (Pro12Ala) do gene *PPARg* e o IMC no grupo de gestantes saudáveis;

Gestantes saudáveis portadores do alelo G (genótipos CG ou GG; Pro/Ala ou Ala/Ala) apresentam um aumento significativo ($P=0,003$) no índice de massa corpórea (IMC), de 2,2 kg/m² em média, quando comparadas aos homozigotos CC (Pro/Pro). Esta associação não está presente em gestantes diabéticas;

Gestantes diabéticas portadoras da presença do alelo G (genótipos CG ou GG; Pro/Ala+Ala/Ala) apresentam concentrações séricas mais elevadas de HDL-C do que àquelas portadoras do alelo C (genótipo CC; Pro/Pro);

- Gestantes com diabetes gestacional portadoras da presença do alelo T (genótipos CT+TT) do polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8* apresentam um aumento na concentração sérica do 1,5 anidroglicitol quando comparadas às portadoras do genótipo CC, sugerindo melhor controle glicêmico. Este efeito não foi observado em gestantes saudáveis;
- As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos em estudo são em geral similares às aquelas descritas para outras populações caucasoides e significativamente diferentes de orientais;
- As concentrações séricas de carboximetilisina (CML/Lisina) e pentosidina (pentosidina/lisina), quantificadas por LC-MS/MS, são significativamente maiores ($P < 0,05$) em gestantes diabéticas quando comparado à saudáveis. Estas biomoléculas tem potencial como biomarcadores para o diabetes gestacional;
- A biomolécula metilglioxal derivado hidroimidazolona 1 (MG-H1) apresenta concentrações séricas similares em gestantes com diabetes e saudáveis;
- O índice aterogênico do plasma calculado pelo Log(TG/HDL-C) permitiu a identificação de mulheres com baixo risco para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* gestacional antes das 24 semanas de gestação;
Gestantes com Log(TG/HDL) menor que 0,454, calculado com a concentração de triglicérides e HDL-Colesterol em mg/dL, antes da 24ª semana de gestação, apresentam risco menor para o *diabetes mellitus* gestacional. Este índice tem potencial aplicação na triagem do diabetes gestacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABORDO, E. A.; THORNALLEY, P. J. Synthesis and secretion of tumour necrosis factor-alpha by human monocytic THP-1 cells and chemotaxis induced by human serum albumin derivatives modified with methylglyoxal and glucose-derived advanced glycation endproducts. **Immunol Lett**, v. 58, n. 3, p. 139–47, 1997.

ACOG, P. B. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. **Obstet Gynecol**, v. 98, n. 30, p. 525–538, 2001.

ADAMS, A. K.; HARVEY, H. E.; PRINCE, R. J. Association of maternal smoking with overweight at age 3 y in American Indian children. **Am J Clin Nutr**, v. 82, n. 2, p. 393–8, 2005.

AFONINA, I. et al. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 13, p. 2657–60, 1997.

AGGARWAL, P. et al. Identification of mtDNA mutation in a pedigree with gestational diabetes, deafness, Wolff-Parkinson-White syndrome and placenta accreta. **Hum Hered**, v. 51, n. 1-2, p. 114–6, 2001.

AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Endocr Rev**, v. 20, n. 2, p. 101–35, 1999.

AHMED, M. U. et al. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. **Biochem J**, v. 324 (Pt 2), p. 565–70, 1997.

AHMED, M. U.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. **J Biol Chem**, v. 261, n. 11, p. 4889–94, 1986.

AHMED, N. et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 12, p. 5287–92, 2003.

AHMED, N.; THORNALLEY, P. J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? **Diabetes Obes Metab**, v. 9, n. 3, p. 233–45, 2007.

AITTONIEMI, J. et al. Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364, n. 1514, p. 257–67, 2009.

ALCOLADO, J. C. et al. Mitochondrial gene defects in patients with NIDDM. **Diabetologia**, v. 37, n. 4, p. 372–6, 1994.

ALCOLADO, J. C.; ALCOLADO, R. Importance of maternal history of non-insulin dependent diabetic patients. **BMJ**, v. 302, n. 6786, p. 1178–80, 1991.

ALEVIZAKI, M. et al. Study of the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor in Greek women with gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 8, p. 1079–83, 2000.

ALI, O. Genetics of type 2 diabetes. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 4, p. 114–123, 15 ago. 2013.

ALLAN, C. J. et al. Gestational diabetes mellitus and gene mutations which affect insulin secretion. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 36, n. 3, p. 135–41, 1997.

AMERICAN DIABETES, A. Standards of medical care in diabetes–2009. **Diabetes Care**, v. 32 Suppl 1, p. S13–61, 2009.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34 Suppl 1, p. S62–69, 2011.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, p. S64–71, 2012.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36 Suppl 1, p. S67–74, 2013.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37 Suppl 1, p. S81–90, 2014.

AMERICAN DIABETES, A. Standards of medical care in diabetes–2014. **Diabetes Care**, v. 37 Suppl 1, p. S14–80, 2014.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–65, 1981.

ANGUIZOLA, J. et al. Review: Glycation of human serum albumin. **Clin Chim Acta**, v. 425, p. 64–76, 2013.

ANNA, V. et al. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2288–93, 2008.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2003.

ASHCROFT, F. M. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. **Annu Rev Neurosci**, v. 11, p. 97–118, 1988.

AUWERX, J. Nuclear receptors. I. PPAR gamma in the gastrointestinal tract: gain or pain? **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 282, n. 4, p. G581–5, 2002.

AWADALLA, P.; EYRE-WALKER, A.; SMITH, J. M. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. **Science**, v. 286, n. 5449, p. 2524–5, 1999.

BALAJI, V. et al. A1C in gestational diabetes mellitus in Asian Indian women. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1865–7, 2007.

BASEVI, V. et al. Comment on: American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes–2011. *Diabetes Care* 2011;34(Suppl. 1):S11–S61. **Diabetes Care**, v. 34, n. 5, p. e53; author reply e54, 2011.

BATTERSBY, B. J.; LOREDO-OSTI, J. C.; SHOUBRIDGE, E. A. Nuclear genetic control of mitochondrial DNA segregation. **Nature genetics**, v. 33, n. 2, p. 183–6, 2003.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–12, 1991.

BAYNES, J. W. The clinical chemome: a tool for the diagnosis and management of chronic disease. **Clin Chem**, v. 50, n. 7, p. 1116–7, 2004.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 1999.

BEEN, L. F. et al. Variants in KCNQ1 increase type II diabetes susceptibility in South Asians: a study of 3,310 subjects from India and the US. **BMC medical genetics**, v. 12, p. 18, 2011.

BEISSWENGER, P. J. et al. Increased collagen-linked pentosidine levels and advanced glycosylation end products in early diabetic nephropathy. **J Clin Invest**, v. 92, n. 1, p. 212–7, 1993.

BELFER, I. et al. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. **J Hum Genet**, v. 50, n. 1, p. 12–20, 2005.

BENOWITZ, N. L. Nicotine addiction. **Prim Care**, v. 26, n. 3, p. 611–31, 1999.

BERGER, H. et al. Screening for gestational diabetes mellitus. **J Obstet Gynaecol Can**, v. 24, n. 11, p. 894–912, 2002.

BIESENBACH, G.; ZAZGORNIK, J. Incidence of transient nephrotic syndrome during pregnancy in diabetic women with and without pre-existing microalbuminuria. **BMJ**, v. 299, n. 6695, p. 366–7, 1989.

BILDIRICI, I. et al. The Lipid Droplet-Associated Protein Adipophilin Is Expressed in Human Trophoblasts and Is Regulated by Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor- γ /Retinoid X Receptor. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 12, p. 6056–6062, dez. 2003.

BOESGAARD, T. W. et al. Variants at DGKB/TMEM195, ADRA2A, GLIS3 and C2CD4B loci are associated with reduced glucose-stimulated beta cell function in middle-aged Danish people. **Diabetologia**, v. 53, n. 8, p. 1647–55, 2010.

BOLTON, W. K. et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. **American journal of nephrology**, v. 24, n. 1, p. 32–40, 2004.

BRODY, S. C.; HARRIS, R.; LOHR, K. Screening for gestational diabetes: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. **Obstet Gynecol**, v. 101, n. 2, p. 380–92, 2003.

BROUWERS, O. et al. Overexpression of glyoxalase-I reduces hyperglycemia-induced levels of advanced glycation end products and oxidative stress in diabetic rats. **J Biol Chem**, v. 286, n. 2, p. 1374–80, 2011.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–20, 2001.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLAASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med**, v. 318, n. 20, p. 1315–21, 1988.

BUCALA, R.; VLAASSARA, H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. **Am J Kidney Dis**, v. 26, n. 6, p. 875–88, 1995.

BUCHANAN, T. A. et al. Gestational diabetes: antepartum characteristics that predict postpartum glucose intolerance and type 2 diabetes in Latino women. **Diabetes**, v. 47, n. 8, p. 1302–10, 1998.

BUCHANAN, T. A. et al. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S105–11, 2007.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, n. 3, p. 485–91, 2005.

BUHIMSCHI, I. A. et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) system in women with intraamniotic infection and inflammation. **Am J Obstet Gynecol**, v. 196, n. 2, p. 181 e1–13, 2007.

BUONGIORNO, A. M. et al. Levels of advanced glycosylation end-products (AGE) in sera of pregnant diabetic women: comparison between type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus. **Ann Ist Super Sanita**, v. 33, n. 3, p. 375–8, 1997.

BURTIS, C. A. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

BUTTE, N. F. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1256S–61S, 2000.

BYLUND, D. B. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? **British journal of pharmacology**, v. 144, n. 2, p. 159–60, 2005.

CAPOBIANCO, E. et al. PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 377, n. 1–2, p. 7–15, 5 set. 2013.

CARPENTER, M. W. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S246–50, 2007.

CARTIER, E. A. et al. Defective trafficking and function of KATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 5, p. 2882–7, 2001.

CASEY, B. M. et al. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes compared with the general obstetric population. **Obstet Gynecol**, v. 90, n. 6, p. 869–73, 1997.

CATALANO, M. et al. The Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with plasma levels of soluble RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) and the presence of peripheral arterial disease. **Clin Biochem**, v. 41, n. 12, p. 981–5, 2008.

CATALANO, P. M. et al. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 282, n. 3, p. E522–533, mar. 2002.

CERAMI, C. et al. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13915–20, 1997.

CHEKIR, C. et al. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. **Placenta**, v. 27, n. 2-3, p. 225–33, 2006.

CHEN, H. H. et al. Severe obesity is associated with novel single nucleotide polymorphisms of the ESR1 and PPARgamma locus in Han Chinese. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 2, p. 255–62, 2009.

CHEN, X. et al. Association of the ADRA2A polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. **Clin Biochem**, v. 46, n. 9, p. 722–6, 2013.

CHEN, Y. et al. Mitochondrial gene mutations in gestational diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 48, n. 1, p. 29–35, 2000.

CHEN, Z. et al. KCNQ1 gene polymorphisms are associated with lipid parameters in a Chinese Han population. **Cardiovasc Diabetol**, v. 9, p. 35, 2010.

CHENG, S. H. et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 827–34, 1990.

CHENG, Y. et al. [Genotype discrepancy between maternal and fetal Pro12Ala polymorphism of PPARG2 gene and its association with gestational diabetes mellitus]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, v. 45, n. 3, p. 170–3, 2010.

CHINNERY, P. F. et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **Ann Neurol**, v. 48, n. 2, p. 188–93, 2000.

CHINNERY, P.F. et al. The spectrum of hearing loss due to mitochondrial DNA defects. **Brain**, v. 123, p. 82-92, 2000.

CHO, Y. M. et al. Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. **Diabetologia**, v. 52, n. 2, p. 253–61, 2009.

CHON, S. J. et al. Association of variants in PPARgamma(2), IGF2BP2, and KCNQ1 with a susceptibility to gestational diabetes mellitus in a Korean population. **Yonsei Med J**, v. 54, n. 2, p. 352–7, 2013.

CHUANG, L. M. et al. Mitochondrial gene mutations in patients with insulin-dependent diabetes mellitus in Taiwan. **Pancreas**, v. 12, n. 3, p. 243–7, 1996.

CLEMENT, J. P. TH et al. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. **Neuron**, v. 18, n. 5, p. 827–38, 1997.

COOKE, C. L. et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 22, n. 2, p. 173–84, 2003.

COUSTAN, D. R. Pregnancy in a young diabetic. **Hosp Pract (Off Ed)**, v. 24, n. 10A, p. 75–8, 81–4, 87–8, 1989.

COUSTAN, D. R. et al. Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. **Obstet Gynecol**, v. 73, n. 4, p. 557–61, 1989.

COUTINHO TDE, A. et al. Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 1, p. 83–9, 2007.

CROWTHER, C. A. et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. **N Engl J Med**, v. 352, n. 24, p. 2477–86, 2005.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

DAVISON, J. M.; DUNLOP, W. Renal hemodynamics and tubular function normal human pregnancy. **Kidney Int**, v. 18, n. 2, p. 152–61, 1980.

DE LEON, D. D.; STANLEY, C. A. Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v. 3, n. 1, p. 57–68, 2007.

DEAN, M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. **Methods Enzymol**, v. 400, p. 409–29, 2005.

DEEB, S. S. et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. **Nat Genet**, v. 20, n. 3, p. 284–7, 1998.

DEGENHARDT, T. P. et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. **Kidney Int**, v. 61, n. 3, p. 939–50, 2002.

DELITALA, G. et al. Opioid peptide and alpha-adrenoceptor pathways in the regulation of the pituitary-adrenal axis in man. **The Journal of endocrinology**, v. 141, n. 1, p. 163–8, 1994.

DEVEDJIAN, J. C. et al. Transgenic mice overexpressing alpha2A-adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. **Diabetologia**, v. 43, n. 7, p. 899–906, 2000.

DI CIANNI, G. et al. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 19, n. 4, p. 259–70, 2003.

DI CIANNI, G. et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. **Diabet Med**, v. 22, n. 1, p. 21–5, 2005.

DOBIASOVA, M. et al. High-density lipoprotein subclasses and esterification rate of cholesterol in children: effect of gender and age. **Acta paediatrica**, v. 87, n. 9, p. 918–23, 1998.

DOBIASOVA, M.; FROHLICH, J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). **Clin Biochem**, v. 34, n. 7, p. 583–8, 2001.

DONEY, A. S. et al. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 555–8, 2004.

DORIA, A.; PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. **Cell metabolism**, v. 8, n. 3, p. 186–200, 2008.

DORN, G. W. Adrenergic Signaling Polymorphisms and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 1013–1062, 1 jul. 2010.

DORNER, G.; PLAGEMANN, A.; REINAGEL, H. Familial diabetes aggregation in type I diabetics: gestational diabetes an apparent risk factor for increased diabetes susceptibility in the offspring. **Exp Clin Endocrinol**, v. 89, n. 1, p. 84–90, 1987.

DOS SANTOS-WEISS, I. C. et al. The plasma logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy. **Clin Chim Acta**, v. 418, p. 1–4, 2013.

- DUBOIS, M. et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. **Diabetologia**, v. 43, n. 9, p. 1165–9, 2000.
- DUBUQUOY, L. et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. **Lancet**, v. 360, n. 9343, p. 1410–8, 2002.
- DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 8, n. 1, p. 9–19, 2008.
- DUNN, J. A. et al. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. **Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1205–10, 1991.
- DUNNE, M. J. et al. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 239–75, 2004.
- DUPUIS, J. et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. **Nat Genet**, v. 42, n. 2, p. 105–16, 2010.
- DYER, D. G. et al. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. **J Biol Chem**, v. 266, n. 18, p. 11654–60, 1991.
- DYER, D. G. et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. **J Clin Invest**, v. 91, n. 6, p. 2463–9, 1993.
- ELLIOTT, B. D. et al. Insignificant transfer of glyburide occurs across the human placenta. **Am J Obstet Gynecol**, v. 165, n. 4 Pt 1, p. 807–12, 1991.
- ENGLAND, L. J. et al. Preventing type 2 diabetes: public health implications for women with a history of gestational diabetes mellitus. **Am J Obstet Gynecol**, v. 200, n. 4, p. 365 e1–8, 2009.
- EVARISTO-NETO, A. D.; FOSS-FREITAS, M. C.; FOSS, M. C. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in a rural community of Angola. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 2, p. 63, 1 nov. 2010.
- FAGERHOLM, V. et al. Altered glucose homeostasis in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Pharmacol**, v. 505, n. 1-3, p. 243–52, 2004.
- FAJANS, S. S.; BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. **N Engl J Med**, v. 345, n. 13, p. 971–80, 2001.
- FAJAS, L. et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. **J Biol Chem**, v. 272, n. 30, p. 18779–89, 1997.
- FALLUCCA, F. et al. Polymorphisms of insulin receptor substrate 1 and beta3-adrenergic receptor genes in gestational diabetes and normal pregnancy. **Metabolism**, v. 55, n. 11, p. 1451–6, 2006.

FARMER, S. Transcriptional control of adipogenesis: interplay between C/EBPs and PPAR γ in regulating adipocyte gene expression. In: G, M.-N. (Ed.). **Progress in obesity research**. Paris: John Libbey Eurotext, 2003. p. 15–18.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization- principles and practice. **Mass Spectrom Rev**, v. 9, p. 37–70, 1990.

FESTA, A. et al. Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in pregnancy: association with mild gestational diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 5, p. 1695–9, 1999.

FIGAROLA, J. L. et al. Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 647–55, 2007.

FLANAGAN, S. E. et al. Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. **Diabetes**, v. 56, n. 7, p. 1930–7, 2007.

FLANAGAN, S. E. et al. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. **Hum Mutat**, v. 30, n. 2, p. 170–80, 2009.

FLANAGAN, S. E. et al. Dominantly acting ABCC8 mutations in patients with medically unresponsive hyperinsulinaemic hypoglycaemia. **Clinical genetics**, v. 79, n. 6, p. 582–7, 2011.

FLORES-LE ROUX, J. A. et al. Seven-year mortality in heart failure patients with undiagnosed diabetes: an observational study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, p. 39, 14 maio 2011.

FOURNET, J. C.; JUNIEN, C. The genetics of neonatal hyperinsulinism. **Horm Res**, v. 59 Suppl 1, p. 30–4, 2003.

FOWLER, M. J. Diabetes: magnitude and mechanisms. **Clin. Diabetes**, v. 25, p. 25–28, 2007.

FRAYLING, T. M. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 9, p. 657–62, 2007.

FREDERIKSEN, A. L. et al. High prevalence of impaired glucose homeostasis and myopathy in asymptomatic and oligosymptomatic 3243A>G mitochondrial DNA mutation-positive subjects. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 8, p. 2872–9, 2009.

FUJITA, H. et al. Variations with modest effects have an important role in the genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits. **J Hum Genet**, v. 57, n. 12, p. 776–9, 2012.

FUKS, A. G. Insulinoterapia no Diabetes mellitus tipo 2: quando e como iniciar. **Int Clin Med.**, v. 1, n. A2, 2008.

GALTIER-DEREURE, F.; BOEGNER, C.; BRINGER, J. Obesity and pregnancy: complications and cost. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1242S–8S, 2000.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 1996.

GILES, R. E. et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6715–9, 1980.

GILMARTIN, A. B.; URAL, S. H.; REPKE, J. T. Gestational diabetes mellitus. **Rev Obstet Gynecol**, v. 1, n. 3, p. 129–34, 2008.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Exp Hematol.**, v. 30, p. 503–512, 2002.

GLOYN, A. L. et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. **N Engl J Med**, v. 350, n. 18, p. 1838–49, 2004.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 4, p. 1143–52, 2008.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597–605, 2006.

GOTO, Y.; NONAKA, I.; HORAI, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**, v. 348, n. 6302, p. 651–3, 1990.

GRANDHEE, S. K.; MONNIER, V. M. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. **J Biol Chem**, v. 266, n. 18, p. 11649–53, 1991.

GREAVES, L. C.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations and ageing. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 10, p. 1015–20, 2009.

GUILLAUSSÉAU, P. J. et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. **Ann Intern Med**, v. 134, n. 9 Pt 1, p. 721–8, 2001.

GUOSHENG, L. et al. The relationship of serum AGE levels in diabetic mothers with adverse fetal outcome. **J Perinatol**, v. 29, n. 7, p. 483–8, 2009.

HAMADA, Y. et al. Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 228, n. 2, p. 539–43, 1996.

HAMMES, H. P. et al. Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. **Diabetologia**, v. 42, n. 6, p. 728–36, 1999.

HANNON, T. S. et al. Use of markers of dyslipidemia to identify overweight youth with insulin resistance. **Pediatr Diabetes**, v. 7, n. 5, p. 260–6, 2006.

HANSEN, S. K. et al. Analysis of separate and combined effects of common variation in KCNJ11 and PPARG on risk of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 6, p. 3629–37, 2005.

HAO, L. et al. Adverse effects of advanced glycation end products on embryonal development. **Acta Med Okayama**, v. 62, n. 2, p. 93–9, 2008.

HARSEM, N. K. et al. Advanced glycation end products in pregnancies complicated with diabetes mellitus or preeclampsia. **Hypertens Pregnancy**, v. 27, n. 4, p. 374–86, 2008.

HATTERSLEY, A. T.; ASHCROFT, F. M. Activating mutations in Kir6.2 and neonatal diabetes: new clinical syndromes, new scientific insights, and new therapy. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2503–13, 2005.

HEDDERSON, M. M.; FERRARA, A. High blood pressure before and during early pregnancy is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, n. 12, p. 2362–7, 2008.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, n. 10, p. 986–94, 1996.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43–55, 2002.

HERRERA, E.; ORTEGA-SENOVILLA, H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy - Are these the cause of the problem? **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 24, n. 4, p. 515–25, 2010.

HEUDE, B. et al. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARGgamma and their haplotypes with susceptibility to gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 10, p. E1656–60, 2011.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)**, v. 11, n. 9, p. 1026–30, 1993.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2007.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7276–80, 1991.

HSUEH, W. A.; LAW, R. E. PPARGgamma and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, n. 12, p. 1891–5, 2001.

HU, C. et al. Variations in KCNQ1 are associated with type 2 diabetes and beta cell function in a Chinese population. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1322–5, 2009.

HU, C. et al. Variants from GIPR, TCF7L2, DGKB, MADD, CRY2, GLIS3, PROX1, SLC30A8 and IGF1 are associated with glucose metabolism in the Chinese. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e15542, 2010.

HUOPIO, H. et al. Dominantly inherited hyperinsulinism caused by a mutation in the sulfonylurea receptor type 1. **J Clin Invest**, v. 106, n. 7, p. 897–906, 2000.

HUOPIO, H. et al. A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 301–7, 2003.

HUSSAIN, K. Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a cause of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 11, n. 3, p. 179–83, 2010.

IGL, W. et al. Modeling of environmental effects in genome-wide association studies identifies SLC2A2 and HP as novel loci influencing serum cholesterol levels. **PLoS Genet**, v. 6, n. 1, p. e1000798, 2010.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 6th edn**. 6th edn ed. Brussels, Belgium: [s.n.].

ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645–50, 1990.

JADDOE, V. W. et al. Maternal smoking in pregnancy is associated with cholesterol development in the offspring: A 27-years follow-up study. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 42–8, 2008.

JAISSON, S.; GILLERY, P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. **Clin Chem**, v. 56, n. 9, p. 1401–12, 2010.

JANG, H. C. et al. Short stature in Korean women: a contribution to the multifactorial predisposition to gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 41, n. 7, p. 778–83, 1998.

JANUSZEWSKI, A. S. et al. Plasma 1,5 anhydroglucitol levels, a measure of short-term glycaemia: assay assessment and lower levels in diabetic vs. non-diabetic subjects. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 95, n. 1, p. e17–9, 2012.

JONSSON, A. et al. A variant in the KCNQ1 gene predicts future type 2 diabetes and mediates impaired insulin secretion. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2409–13, 2009.

JOVANOVIC, L. Continuous glucose monitoring during pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus. **Current diabetes reports**, v. 1, n. 1, p. 82–5, 2001.

KALE, S. D. et al. Characteristics of gestational diabetic mothers and their babies in an Indian diabetes clinic. **J Assoc Physicians India**, v. 53, p. 857–63, 2005.

KASS, D. A. et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. **Circulation**, v. 104, n. 13, p. 1464–70, 2001.

KERKENI, M. et al. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Diab Vasc Dis Res**, v. 10, n. 3, p. 239–45, 2013.

KHAN, K. S. et al. WHO analysis of causes of maternal death: a systematic review. **Lancet**, v. 367, n. 9516, p. 1066–74, 2006.

KHINE, M. L.; WINKLESTEIN, A.; COPEL, J. A. Selective screening for gestational diabetes mellitus in adolescent pregnancies. **Obstet Gynecol**, v. 93, n. 5 Pt 1, p. 738–42, 1999.

KILPELAINEN, T. O. et al. Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. **Physiol Genomics**, v. 31, n. 2, p. 264–72, 2007.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1862–8, 2002.

KIM, S. Y. et al. Percentage of gestational diabetes mellitus attributable to overweight and obesity. **American journal of public health**, v. 100, n. 6, p. 1047–52, 2010.

KISHIMOTO, M. et al. Diabetes mellitus carrying a mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. **Diabetologia**, v. 38, n. 2, p. 193–200, 1995.

KISLINGER, T. et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 44, p. 31740–9, 1999.

KITAJIMA, M. et al. Maternal serum triglyceride at 24–32 weeks' gestation and newborn weight in nondiabetic women with positive diabetic screens. **Obstet Gynecol**, v. 97, n. 5 Pt 1, p. 776–80, 2001.

KNOPP, R. H. et al. Population-based lipoprotein lipid reference values for pregnant women compared to nonpregnant women classified by sex hormone usage. **Am J Obstet Gynecol**, v. 143, n. 6, p. 626–37, 1982.

KNOPP, R. H. et al. Prediction of infant birth weight by GDM screening tests. Importance of plasma triglyceride. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1605–13, 1992.

KONISHI, H. et al. Advanced glycation end products induce secretion of chemokines and apoptosis in human first trimester trophoblasts. **Hum Reprod**, v. 19, n. 9, p. 2156–62, 2004.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6474–9, 1997.

KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational diabetes mellitus: a cross-sectional and prospective study. **J Clin Pathol**, v. 49, n. 8, p. 634–7, 1996.

KOVO, M. et al. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 136, n. 1, p. 29–33, 2008.

KRONENBERG, H. M. et al. **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders/ Elsevier, 2008.

KUTYAVIN, I. V. et al. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 18, p. 3718–23, 1997.

KWAK, S. H. et al. Polymorphisms in KCNQ1 are associated with gestational diabetes in a Korean population. **Horm Res Paediatr**, v. 74, n. 5, p. 333–8, 2010.

KWAK, S. H.; JANG, H. C.; PARK, K. S. Finding genetic risk factors of gestational diabetes. **Genomics Inform**, v. 10, n. 4, p. 239–43, 2012.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LANDON, M. B. et al. A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. **N Engl J Med**, v. 361, n. 14, p. 1339–48, 2009.

LANDRETH, G. E.; HENEKA, M. T. Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 22, n. 6, p. 937–44, 2001.

LAPOLLA, A.; BASSO, E.; TRALDI, P. Mass spectrometry of advanced glycation end products. **Adv Clin Chem**, v. 40, p. 165–217, 2005.

LAPOLLA, A.; DALFRA, M. G.; FEDELE, D. Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes mellitus: is it important? **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 19, n. 9, p. 674–82, 2009.

LAPPAS, M. Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 63, n. 2, p. 250–262, fev. 2014.

LAPPAS, M.; PERMEZEL, M.; RICE, G. E. Advanced glycation endproducts mediate pro-inflammatory actions in human gestational tissues via nuclear factor-kappaB and extracellular signal-regulated kinase 1/2. **J Endocrinol**, v. 193, n. 2, p. 269–77, 2007.

LAUENBORG, J. et al. The prevalence of the metabolic syndrome in a danish population of women with previous gestational diabetes mellitus is three-fold higher than in the general population. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 7, p. 4004–10, 2005.

LAUENBORG, J. et al. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 1, p. 145–50, 2009.

LAUGHON, S. K. et al. Elevated first-trimester uric acid concentrations are associated with the development of gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol**, v. 201, n. 4, p. 402 e1–5, 2009.

LAUKKANEN, O. et al. Polymorphisms of the SUR1 (ABCC8) and Kir6.2 (KCNJ11) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 12, p. 6286–90, 2004.

LAUKKANEN, O. et al. Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2256–60, 2005.

LEE, Y. H. et al. Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population. **J Hum Genet**, v. 53, n. 11-12, p. 991–8, 2008.

LEIPOLD, H. et al. Calpain-10 haplotype combination and association with gestational diabetes mellitus. **Obstet Gynecol**, v. 103, n. 6, p. 1235–40, 2004.

LEWIS, J. D. et al. An open-label trial of the PPAR-gamma ligand rosiglitazone for active ulcerative colitis. **The American journal of gastroenterology**, v. 96, n. 12, p. 3323–8, 2001.

LI, Y. et al. Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR-alpha/-gamma activator properties. **Diabetes Obes Metab**, v. 10, n. 1, p. 10–7, 2008.

LIGGETT, S. B. alpha2A-adrenergic receptors in the genetics, pathogenesis, and treatment of type 2 diabetes. **Sci Transl Med**, v. 1, n. 12, p. 12ps15, 2009.

LIN, R. Y. et al. Dietary glycotoxins promote diabetic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 168, n. 2, p. 213–20, 2003.

LINDHEIMER, M. D.; TALER, S. J.; CUNNINGHAM, F. G. Hypertension in pregnancy. **J Am Soc Hypertens**, v. 2, n. 6, p. 484–94, 2008.

LIU, Y. et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in the population of mainland China. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1315–21, 2009.

LO, T. W. et al. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. **J Biol Chem**, v. 269, n. 51, p. 32299–305, 1994.

LOWELL, B. B.; SHULMAN, G. I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 384–7, 2005.

LU, H. et al. Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with beta-cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 2, p. 448–59, 2010.

MAASSEN, J. A. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. **Am J Med Genet**, v. 115, n. 1, p. 66–70, 2002.

MAASSEN, J. A. et al. Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation. **Diabetes**, v. 53 Suppl 1, p. S103–9, 2004.

MAASSEN, J. A.; KADOWAKI, T. Maternally inherited diabetes and deafness: a new diabetes subtype. **Diabetologia**, v. 39, n. 4, p. 375–82, 1996.

MACDONALD, P. E.; WHEELER, M. B. Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. **Diabetologia**, v. 46, n. 8, p. 1046–62, 2003.

MAECHLER, P.; WOLLHEIM, C. B. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 807–12, 2001.

MAGANHA, C. A. et al. [Management of gestational diabetes]. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, v. 49, n. 3, p. 330–4, 2003.

MAILLARD, L. C. The action of amino acids on sugar: the formation of melanoidin by a methodic route. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v. 154, p. 66–68, 1912.

MAJAMAA, K. et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: prevalence of the mutation in an adult population. **Am J Hum Genet**, v. 63, n. 2, p. 447–54, 1998.

MAKITA, Z. et al. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. **Lancet**, v. 343, n. 8912, p. 1519–22, 1994.

MANNIKKO, R. et al. Mutations of the same conserved glutamate residue in NBD2 of the sulfonylurea receptor 1 subunit of the KATP channel can result in either hyperinsulinism or neonatal diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 6, p. 1813–22, 2011.

MANWARING, N. et al. Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. **Mitochondrion**, v.7, p. 230–33, 2007.

MARCOVECCHIO, M. L.; LUCANTONI, M.; CHIARELLI, F. Role of chronic and acute hyperglycemia in the development of diabetes complications. **Diabetes Technol Ther**, v. 13, n. 3, p. 389–94, 2011.

MARSEILLE-TREMBLAY, C. et al. Impact of maternal circulating cholesterol and gestational diabetes mellitus on lipid metabolism in human term placenta. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 6, p. 1054–62, 2008.

MARTIN, A. O. et al. Frequency of diabetes mellitus in mothers of probands with gestational diabetes: possible maternal influence on the predisposition to gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 151, n. 4, p. 471–5, 1985.

- MARTIN, U. et al. Is normal pregnancy atherogenic? **Clinical science**, v. 96, n. 4, p. 421–5, 1999.
- MASUD, S.; YE, S.; GROUP, S. A. S. Effect of the peroxisome proliferator activated receptor-gamma gene Pro12Ala variant on body mass index: a meta-analysis. **J Med Genet**, v. 40, n. 10, p. 773–80, 2003.
- MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 7, p. 927–32, 2007.
- MCCANCE, D. R. et al. Urinary albumin excretion in diabetic pregnancy. **Diabetologia**, v. 32, n. 4, p. 236–9, 1989.
- MCCANCE, D. R. et al. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 91, n. 6, p. 2470–8, 1993.
- MCCULLOCH, L. J. et al. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. **Mol Genet Metab**, v. 104, n. 4, p. 648–53, 2011.
- MCGLADDERY, S. H.; FROHLICH, J. J. Lipoprotein lipase and apoE polymorphisms: relationship to hypertriglyceridemia during pregnancy. **J Lipid Res**, v. 42, n. 11, p. 1905–12, 2001.
- MCGROWDER, D. et al. Lipid profile and clinical characteristics of women with gestational diabetes mellitus and preeclampsia. **JMB**, v. 28, p. 72–81, 2009.
- MCLAUGHLIN, T. et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. **Ann Intern Med**, v. 139, n. 10, p. 802–9, 2003.
- MEERWALDT, R. et al. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v. 7, p. 29, 2008.
- MEGAHED, M. A.; TAHER, I. M. Folate and homocysteine levels in pregnancy. **Br J Biomed Sci**, v. 61, n. 2, p. 84–7, 2004.
- MEIRHAEGHE, A. et al. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum Mol Genet**, v. 7, n. 3, p. 435–40, 1998.
- MEIRHAEGHE, A. et al. A possible role for the PPARG Pro12Ala polymorphism in preterm birth. **Diabetes**, v. 56, n. 2, p. 494–8, 2007.
- MEIRHAEGHE, A.; AMOUYEL, P. Impact of genetic variation of PPARGgamma in humans. **Mol Genet Metab**, v. 83, n. 1-2, p. 93–102, 2004.
- MERZOUK, H. et al. Impaired serum lipids and lipoproteins in fetal macrosomia related to maternal obesity. **Biol Neonate**, v. 77, n. 1, p. 17–24, 2000.
- METZGER, B. E. et al. Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids, and individual amino acids. **Diabetes Care**, v. 3, n. 3, p. 402–9, 1980.

METZGER, B. E. et al. Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S251–60, 2007.

METZGER, B. E. et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **N Engl J Med**, v. 358, n. 19, p. 1991–2002, 2008.

METZGER, B. E. et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. **Diabetes Care**, v. 33, n. 3, p. 676–82, 2010.

MEYER, W. J. et al. Early gestational glucose screening and gestational diabetes. **The Journal of reproductive medicine**, v. 41, n. 9, p. 675–9, 1996.

MIKHAILOV, M. V. et al. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. **EMBO J**, v. 24, n. 23, p. 4166–75, 2005.

MIYATA, T. et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. **Kidney Int**, v. 53, n. 2, p. 416–22, 1998.

MURATA, T. et al. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. **Diabetologia**, v. 40, n. 7, p. 764–9, 1997.

MUSSIG, K. et al. Association of type 2 diabetes candidate polymorphisms in KCNQ1 with incretin and insulin secretion. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1715–20, 2009.

NAKAMURA, K. et al. Serum levels of sRAGE, the soluble form of receptor for advanced glycation end products, are associated with inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. **Molecular medicine**, v. 13, n. 3-4, p. 185–9, 2007.

NAKANO, M. et al. The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. **Amino Acids**, v. 44, n. 6, p. 1451–6, 2013.

NEGRATO, C. A. et al. Dysglycemias in pregnancy: from diagnosis to treatment. Brazilian consensus statement. **Diabetol Metab Syndr**, v. 2, p. 27, 2010.

NEGRATO, C. A.; MATTAR, R.; GOMES, M. B. Adverse pregnancy outcomes in women with diabetes. **Diabetol Metab Syndr**, v. 4, n. 1, p. 41, 2012.

NEYROUD, N. et al. Genomic organization of the KCNQ1 K⁺ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. **Circulation research**, v. 84, n. 3, p. 290–7, 1999.

NICHOLL, I. D. et al. Increased levels of advanced glycation endproducts in the lenses and blood vessels of cigarette smokers. **Molecular medicine**, v. 4, n. 9, p. 594–601, 1998.

NIROMANESH, S. et al. Metformin compared with insulin in the management of gestational diabetes mellitus: a randomized clinical trial. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 98, n. 3, p. 422–9, 2012.

NOLAN, C. J. et al. Maternal serum triglyceride, glucose tolerance, and neonatal birth weight ratio in pregnancy. **Diabetes Care**, v. 18, n. 12, p. 1550–6, 1995.

NOLAN, C. J.; PRENTKI, M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 19, n. 8, p. 285–91, 2008.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. **PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR)**. [s.l: s.n.]. v. 33

OBER, C. et al. Increased risk for gestational diabetes mellitus associated with insulin receptor and insulin-like growth factor II restriction fragment length polymorphisms. **Genet Epidemiol**, v. 6, n. 5, p. 559–69, 1989.

ODETTI, P. et al. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. **Diabetes**, v. 41, n. 2, p. 153–9, 1992.

OLIVEIRA, M. I. A. et al. RAGE receptor and its soluble isoforms in diabetes mellitus complications. **J Bras Patol Med Lab**, v. 49, n. 2, p. 97–108, 2013.

ONG, K. K. et al. Size at birth and early childhood growth in relation to maternal smoking, parity and infant breast-feeding: longitudinal birth cohort study and analysis. **Pediatr Res**, v. 52, n. 6, p. 863–7, 2002.

ORDOVAS, J. M.; POCOVI, M.; GRANDE, F. Plasma lipids and cholesterol esterification rate during pregnancy. **Obstet Gynecol**, v. 63, n. 1, p. 20–5, 1984.

ORNOY, A. Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. **Reprod Toxicol**, v. 32, n. 2, p. 205–12, 2011.

PAPPA, K. I. et al. Gestational diabetes mellitus shares polymorphisms of genes associated with insulin resistance and type 2 diabetes in the Greek population. **Gynecol Endocrinol**, v. 27, n. 4, p. 267–72, 2011.

PARK, S. H.; GOO, J. M.; JO, C. H. Receiver operating characteristic (ROC) curve: practical review for radiologists. **Korean J Radiol**, v. 5, n. 1, p. 11–8, 2004.

PASCOE, L. et al. Beta cell glucose sensitivity is decreased by 39% in non-diabetic individuals carrying multiple diabetes-risk alleles compared with those with no risk alleles. **Diabetologia**, v. 51, n. 11, p. 1989–92, 2008.

PEDERSEN, J. Diabetes and pregnancy; blood sugar of newborn infants during fasting and glucose administration. **Ugeskr Laeger**, v. 114, n. 21, p. 685, 1952.

PEPPA, M. et al. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). **American journal of nephrology**, v. 26, n. 5, p. 430–6, 2006.

PERSSON, M.; NORMAN, M.; HANSON, U. Obstetric and perinatal outcomes in type 1 diabetic pregnancies: A large, population-based study. **Diabetes Care**, v. 32, n. 11, p. 2005–9, 2009.

PETRY, C. J. Gestational diabetes: risk factors and recent advances in its genetics and treatment. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 06, p. 775–787, 2010.

PETTITT, D. J. et al. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. **N Engl J Med**, v. 308, n. 5, p. 242–5, 1983.

PIGNATELLI, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is an inhibitor of ErbBs activity in human breast cancer cells. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 22, p. 4117–26, 2001.

PINNEY, S. E. et al. Clinical characteristics and biochemical mechanisms of congenital hyperinsulinism associated with dominant KATP channel mutations. **J Clin Invest**, v. 118, n. 8, p. 2877–86, 2008.

PINNEY, S. E.; SIMMONS, R. A. Metabolic Programming, Epigenetics, and Gestational Diabetes Mellitus. **Curr. Diab. Rep.**, v. 12, n. 1, p. 67–74, 2011.

PINTO, W. J.; GUIDA-CARDOSO, S. M.; AREAS, M. A. Physiology of cardiac adrenoceptors. **Rev. Ciên. Méd.**, v. 14, n. 1, p. 77–96, 2005.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiol Behav**, v. 86, n. 5, p. 661–8, 2005.

PLANTINGA, L. C. et al. Prevalence of Chronic Kidney Disease in US Adults with Undiagnosed Diabetes or Prediabetes. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 5, n. 4, p. 673–682, abr. 2010.

POULTON, J. et al. Mitochondrial DNA, diabetes and pancreatic pathology in Kearns-Sayre syndrome. **Diabetologia**, v. 38, n. 7, p. 868–71, 1995.

POWE, C. E.; THADHANI, R. Diabetes and the kidney in pregnancy. **Semin Nephrol**, v. 31, n. 1, p. 59–69, 2011.

PRENTKI, M.; NOLAN, C. J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1802–12, 2006.

QI, Q. et al. Common variants in KCNQ1 are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a Chinese Han population. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 18, p. 3508–15, 2009.

RAHBAR, S. et al. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. **Clin Chim Acta**, v. 301, n. 1-2, p. 65–77, 2000.

RAMASAMY, R. et al. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, v. 15, n. 7, p. 16R–28R, 2005.

REES, S. D. et al. Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24710, 2011.

RIORDAN, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1066–73, 1989.

RISSANEN, J. et al. Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 70–3, 2000.

ROBBINS, J. KCNQ potassium channels: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Ther**, v. 90, n. 1, p. 1–19, 2001.

RORSMAN, P. et al. Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B cells. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 77–9, 1991.

SACKS, D. A. Gestational diabetes—whom do we treat? **N Engl J Med**, v. 361, n. 14, p. 1396–8, 2009.

SAIF-ALI, R. et al. KCNQ1 variants associate with type 2 diabetes in Malaysian Malay subjects. **Ann Acad Med Singapore**, v. 40, n. 11, p. 488–92, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 3v

SAUNDERS, N. A. Real-time PCR. **Methods Mol Biol**, v. 266, p. 191–211, 2004.

SCAGLIA, F., NORTHROP, L. The mitochondrial myopathy encephalopathy, lactic acidosis with stroke-like episodes (MELAS) syndrome: a review of treatment options. **CNS Drugs**, v. 20, p. 443–64, 2006.

SCHAFF, W. T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4267–4275, jul. 2005.

SCHIEL, R. et al. Improvement in quality of diabetes control and concentrations of AGE-products in patients with type 1 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus studied over a period of 10 years (JEVIN). **J Diabetes Complications**, v. 17, n. 2, p. 90–7, 2003.

SCHIFF, M. et al. Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship? **J Inherit Metab Dis**, v. 32, n. 6, p. 684–98, 2009.

SCHMITZ, J. M. et al. Renal alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors: biochemical and pharmacological correlations. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 219, n. 2, p. 400–6, 1981.

SCOTT, D. A. et al. Screening for gestational diabetes: a systematic review and economic evaluation. **Health Technol Assess**, v. 6, n. 11, p. 1–161, 2002.

SCOTT, L. J. et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1341–5, 2007.

SELL, D. R. et al. Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. **Diabetes Metab Rev**, v. 7, n. 4, p. 239–51, 1991.

SELL, D. R. et al. Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. **Diabetes**, v. 41, n. 10, p. 1286–92, 1992.

SELL, D. R.; MONNIER, V. M. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. **J Clin Invest**, v. 85, n. 2, p. 380–4, 1990.

SHAAT, N. et al. Genotypic and phenotypic differences between Arabian and Scandinavian women with gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 47, n. 5, p. 878–84, 2004.

SHAAT, N. et al. Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 48, n. 12, p. 2544–51, 2005.

SHAAT, N. et al. Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1545–51, 2006.

SHAAT, N. et al. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 50, n. 5, p. 972–9, 2007.

SHAAT, N.; GROOP, L. Genetics of gestational diabetes mellitus. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 5, p. 569–83, 2007.

SHIN, H. D. et al. Association of KCNQ1 polymorphisms with the gestational diabetes mellitus in Korean women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 1, p. 445–9, 2010.

SIMMONS, R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 16, n. 8, p. 390–4, 2005.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129–46, 2001.

SLADEK, R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 881–5, 2007.

SMALL, K. M. et al. An asn to lys polymorphism in the third intracellular loop of the human alpha 2A-adrenergic receptor imparts enhanced agonist-promoted Gi coupling. **J Biol Chem**, v. 275, n. 49, p. 38518–23, 2000.

SMITH, P. R.; THORNALLEY, P. J. Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)hippuryl-lysine. **Eur J Biochem**, v. 210, n. 3, p. 729–39, 1992.

- SOLOMON, C. G. et al. A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus. **JAMA**, v. 278, n. 13, p. 1078–83, 1997.
- SOSKA, V. et al. The atherogenic index of plasma is increased by hormonal contraception. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 71, n. 2, p. 94–100, 2011.
- SPIEGELMAN, B. M. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, n. 4, p. 507–14, 1998.
- SPIJKERMAN, A. M. W. et al. Microvascular Complications at Time of Diagnosis of Type 2 Diabetes Are Similar Among Diabetic Patients Detected by Targeted Screening and Patients Newly Diagnosed in General Practice The Hoorn Screening Study. **Diabetes Care**, v. 26, n. 9, p. 2604–2608, 1 set. 2003.
- SPINAZZOLA, A.; ZEVIANI, M. Mitochondrial diseases: a cross-talk between mitochondrial and nuclear genomes. **Adv Exp Med Biol**, v. 652, p. 69–84, 2009.
- STITT, A. W. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. **Br J Ophthalmol**, v. 85, n. 6, p. 746–53, 2001.
- STUEBE, A. M. et al. Obesity and diabetes genetic variants associated with gestational weight gain. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n. 3, p. 283 e1–17, 2010.
- SUAREZ, Y. et al. Differential effects of ergosterol and cholesterol on Cdk1 activation and SRE-driven transcription. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 6, p. 1761–71, 2002.
- TAKEUCHI, M.; YAMAGISHI, S. Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 16, n. 4, p. 845–58, 2009.
- TALMUD, P. J. et al. Variants of ADRA2A are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk: meta-analysis of four prospective studies. **Diabetologia**, v. 54, n. 7, p. 1710–9, 2011.
- TAM, W. H. et al. Glucose intolerance and cardiometabolic risk in children exposed to maternal gestational diabetes mellitus in utero. **Pediatrics**, v. 122, n. 6, p. 1229–34, 2008.
- TAN, J. T. et al. Genetic variation in KCNQ1 associates with fasting glucose and beta-cell function: a study of 3,734 subjects comprising three ethnicities living in Singapore. **Diabetes**, v. 58, n. 6, p. 1445–9, 2009.
- TAN, M. H.; JOHNS, D.; GLAZER, N. B. Pioglitazone reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes. **Clin Chem**, v. 50, n. 7, p. 1184–8, 2004.
- TANG, S.; HUANG, T. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system. **BioTechniques**, v. 48, p. 287–296, 2010.
- TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 5, p. 389–402, 2005.

TESSIER, F. J. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. **Pathol Biol (Paris)**, v. 58, n. 3, p. 214–9, 2010.

THALLAS-BONKE, V. et al. Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT-711 via a protein kinase C- α -dependent pathway. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 2921–30, 2004.

THOMAS, P. M. et al. Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 426–9, 1995.

THORNALLEY, P. J. et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. **Biochem J**, v. 375, n. Pt 3, p. 581–92, 2003.

THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. **Drugs Aging**, v. 9, n. 2, p. 69–77, 1996.

TOESCU, V. et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. **Clinical science**, v. 106, n. 1, p. 93–8, 2004.

TOK, E. C. et al. PPAR- γ 2 Pro12Ala polymorphism is associated with weight gain in women with gestational diabetes mellitus. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 129, n. 1, p. 25–30, 2006.

TOSCHKE, A. M. et al. Early intrauterine exposure to tobacco-inhaled products and obesity. **Am J Epidemiol**, v. 158, n. 11, p. 1068–74, 2003.

TURHAN, N. O. et al. Assessment of glucose tolerance and pregnancy outcome of polycystic ovary patients. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 81, n. 2, p. 163–8, 2003.

ULLRICH, S. et al. Effects of I(Ks) channel inhibitors in insulin-secreting INS-1 cells. **Pflugers Arch**, v. 451, n. 3, p. 428–36, 2005.

UNOKI, H. et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. **Nat Genet**, v. 40, n. 9, p. 1098–102, 2008.

VALVE, R. et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene are associated with severe overweight among obese women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 10, p. 3708–12, 1999.

VAN DEN ELZEN, H. J. et al. Serum lipids in early pregnancy and risk of pre-eclampsia. **Br J Obstet Gynaecol**, v. 103, n. 2, p. 117–22, 1996.

VAN DEN OUWELAND, J. M. et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. **Nat Genet**, v. 1, n. 5, p. 368–71, 1992.

VAN VLIET-OSTAPTCHOUK, J. V. et al. Common variants in the type 2 diabetes KCNQ1 gene are associated with impairments in insulin secretion during hyperglycaemic glucose clamp. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32148, 2012.

VEERASWAMY, S. et al. Gestational diabetes: the public health relevance and approach. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 97, n. 3, p. 350–8, 2012.

VIDAEFF, A. C.; YEOMANS, E. R.; RAMIN, S. M. Gestational diabetes: a field of controversy. **Obstet Gynecol Surv**, v. 58, n. 11, p. 759–69, 2003.

VIEIRA, T. C. et al. Hyperinsulinemic hypoglycemia evolving to gestational diabetes and diabetes mellitus in a family carrying the inactivating ABCC8 E1506K mutation. **Pediatr Diabetes**, v. 11, n. 7, p. 505–8, 2010.

VLASSARA, H. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. **Annals of medicine**, v. 28, n. 5, p. 419–26, 1996.

VLASSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15596–601, 2002.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J Intern Med**, v. 251, n. 2, p. 87–101, 2002.

WAGNER, Z. et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. **Am J Kidney Dis**, v. 38, n. 4, p. 785–91, 2001.

WALCZAK, R.; TONTONNOZ, P. PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPARgamma in the control of lipid metabolism. **J Lipid Res**, v. 43, n. 2, p. 177–86, 2002.

WALKER, J. J. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 356, n. 9237, p. 1260–5, 2000.

WANG, C. et al. Quantitative assessment of the influence of PPARG P12A polymorphism on gestational diabetes mellitus risk. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 2, p. 811–7, 2013.

WATANABE, R. M. et al. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1481–5, 2007.

WEEDON, M. N. et al. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. **PLoS Med**, v. 3, n. 10, p. e374, 2006.

WEISZ, B. et al. Elevated serum uric acid levels in gestational hypertension are correlated with insulin resistance. **Am J Perinatol**, v. 22, n. 3, p. 139–44, 2005.

WHO. Guidelines for the prevention, management and care of diabetes mellitus. **Geneva World Health Organization**, p. 1–82, 2009.

WITTEWER, C. T.; KUSUKAWA, N. Nucleic acid techniques. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. (Eds.). **Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics**. 4 ed. St. Louis: Elsevier, 2006. p. 1407–1449.

WIZNITZER, A. et al. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational diabetes mellitus: a population-based study. **Am J Obstet Gynecol**, v. 201, n. 5, p. 482 e1–8, 2009.

YAMAGISHI, S. et al. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 5, p. 663–71, 2012.

YAMANOUCHI, T. et al. Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients. **Diabetes**, v. 38, n. 6, p. 723–9, 1989.

YAMANOUCHI, T. et al. Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. **Am J Physiol**, v. 263, n. 2 Pt 1, p. E268–73, 1992.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **J. Phys. Chem**, v. 88, p. 4451–4459, 1984.

YANAGISAWA, K. et al. Mutation in the mitochondrial tRNA(Leu) at position 3243 and spontaneous abortions in Japanese women attending a clinic for diabetic pregnancies. **Diabetologia**, v. 38, n. 7, p. 809–15, 1995.

YASUDA, K. et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. **Nat Genet**, v. 40, n. 9, p. 1092–7, 2008.

YOO, T. W. et al. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**, v. 69, n. 8, p. 928–33, 2005.

ZEVIANI, M.; DI DONATO, S. Mitochondrial disorders. **Brain**, v. 127, p. 2153–72, 2004.

ZHANG, Q. et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **J Proteome Res**, v. 8, n. 2, p. 754–69, 2009.

ZHANG, X. et al. How big is too big? The perinatal consequences of fetal macrosomia. **Am J Obstet Gynecol**, v. 198, n. 5, p. 517 e1–6, 2008.

ZHOU, Q. et al. Association of KCNQ1 gene polymorphism with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. **Diabetologia**, v. 52, n. 11, p. 2466–8, 2009.

ANEXOS

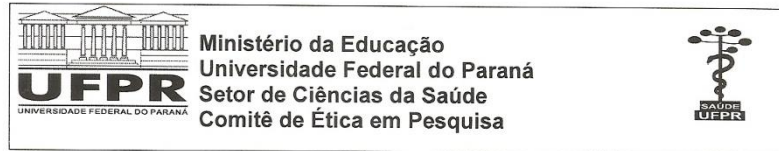
ANEXO 1

Outros tipos específicos de diabetes

Tipos específicos	
Defeitos genéticos na função das células β	Cromossomo 12, HNF-1a (MODY3) Cromossomo 7, glucoquinase (MODY2) Cromossomo 20, HNF-4a (MODY1) Cromossomo 13, promotor de insulina fator-1 (IPF-1; MODY4) Cromossomo 17, HNF-1b (MODY5) Cromossomo 2, NeuroD1 (MODY6) DNA mitocondrial Outros
Defeitos genéticos na ação da insulina	Resistência à insulina tipo A Leprechaunismo Síndrome Rabson-Mendenhall Diabetes lipoatrófica Outros
Doenças do pâncreas exócrino	Pancreatite Trauma/pancreatectomia Neoplasia Fibrose cística Hemocromatose Pancreatopatia fibrocalculosa Outros
Endocrinopatias	Acromegalia Síndrome de Cushing Glucagonoma Feocromocitoma Hipertireoidismo Somatostatinoma Aldosteronoma Outros
Indução química ou por drogas	Vacor Pentamidina Ácido nicotínico Glucocorticóides Hormônio da tireóide Diazoxida Agonistas β -adrenérgicos Tiazidas Fenitoína γ -Interferon Outros
Infecções	Rubéola congênita Citomegalovírus Outros
Formas incomuns de diabetes imuno mediado	Síndrome de "Stiff-man" Os anticorpos anti-receptor de insulina Outros
Outras síndromes genéticas às vezes associadas ao diabetes	Síndrome de Down Síndrome de Klinefelter Síndrome de Turner Síndrome de Wolfram Ataxia de Friedreich Coreia de Huntington Síndrome de Laurence-Moon-Biedl Distrofia miotônica Porfíria Síndrome de Prader-Willi

ANEXO 2

Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR



Curitiba, 07 de julho de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Variações no DNA mitocondrial e biomoléculas marcadoras no diabetes gestacional”** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 26 de maio de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 07 de julho de 2010.

Registro **CEP/SD**: 927.052.10.05 **CAAE**: 1924.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 07/01/2011.

Atenciosamente

Prof.ª. Dr.ª. Liliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dra. Liliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado “**variabilidade genética e biomarcadores associados ao diabetes gestacional**”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.
- b) É importante que você leia e entenda toda a informação dada.
- c) O objetivo desta pesquisa é estudar variações genéticas no DNA e associá-las com o processo do diabetes gestacional.
- d) Caso você participe da pesquisa, não será necessário nenhum procedimento específico, pois será utilizado o sangue já coletado para outros exames de rotina não trazendo para você nenhum desconforto ou risco a mais, a não ser a coleta a qual você já irá realizar para outros exames.
- e) Não há riscos adicionais envolvidos na sua participação neste projeto.
- f) Contudo, os benefícios esperados são: conhecer as variações genéticas dos genes em estudo na população brasileira, procurar marcadores de risco ou proteção para o diabetes gestacional e fornecer elementos para a elaboração de futuras políticas públicas.
- g) Os pesquisadores Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos, Farmacêutica Bioquímica, doutoranda do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná (contato: izabellac@ufpr.br fone (41) 3360-4068), Geraldo Picheth, professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (gpicheth@ufpr.br, fone: 3360-4067) e Emanuel Maltempi de Souza, professor do Program de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (souzaem@ufpr.br, fone: 3360-1567) que poderão ser contatados (na Universidade Federal do Paraná, Curso de Farmácia, Rua Pref. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP 80210-170 em horário comercial) são os responsáveis pelo projeto e poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.
- h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.

- i) A sua participação neste estudo é voluntária (sua escolha). Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não irá afetar de nenhuma maneira seu atendimento, que está garantido.
- j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade (sigilo)** seja mantida.
- k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) **não** são da sua responsabilidade.
- l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- n) As amostras serão conservadas após a realização da pesquisa para posterior utilização em outras pesquisas científicas similares, mantendo-se a confidencialidade (sigilo) das mesmas como dito acima.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss

Pesquisadora responsável

ANEXO 4

Planilha para coleta de dados das gestantes diabéticas

Caracterização do Paciente		Nº protocolo	Data
Nome:			____/____/____

Dados clínicos

N	Dados	Obs.
1	Semana de gestação	[] semanas Número de gestações:
2	Idade	[] anos
3	Peso	Antes= []kg Depois= []kg
4	Altura	[] cm
5	IMC	
6	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
7	Dieta	(1)= Sim (2)= Não
8	Pressão Arterial (PA)	[/] mmHg
9	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
10	Fatores de risco	Idade: (1)= Sim (2) = Não Obesidade: (1)= Sim (2)= Não Macrossomia: (1)= Sim (2)= Não _____ Aborto(s): (1)= Sim (2)= Não Se sim, quantos: _____ Gravidez prévia com DG: (1)= Sim (2)= Não Morte neonatal: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não _____
12	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não _____
13	Medicamentos:	a) Hipoglicemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: b) Hipolipemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: c) Anti-hipertensivos: (1) = Sim (2) = Não Quais: d) Insulina: (1)= Sim (2)= Não Outros:
14	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: TSH: Outros:
15	Outras patologias:	

ANEXO 5

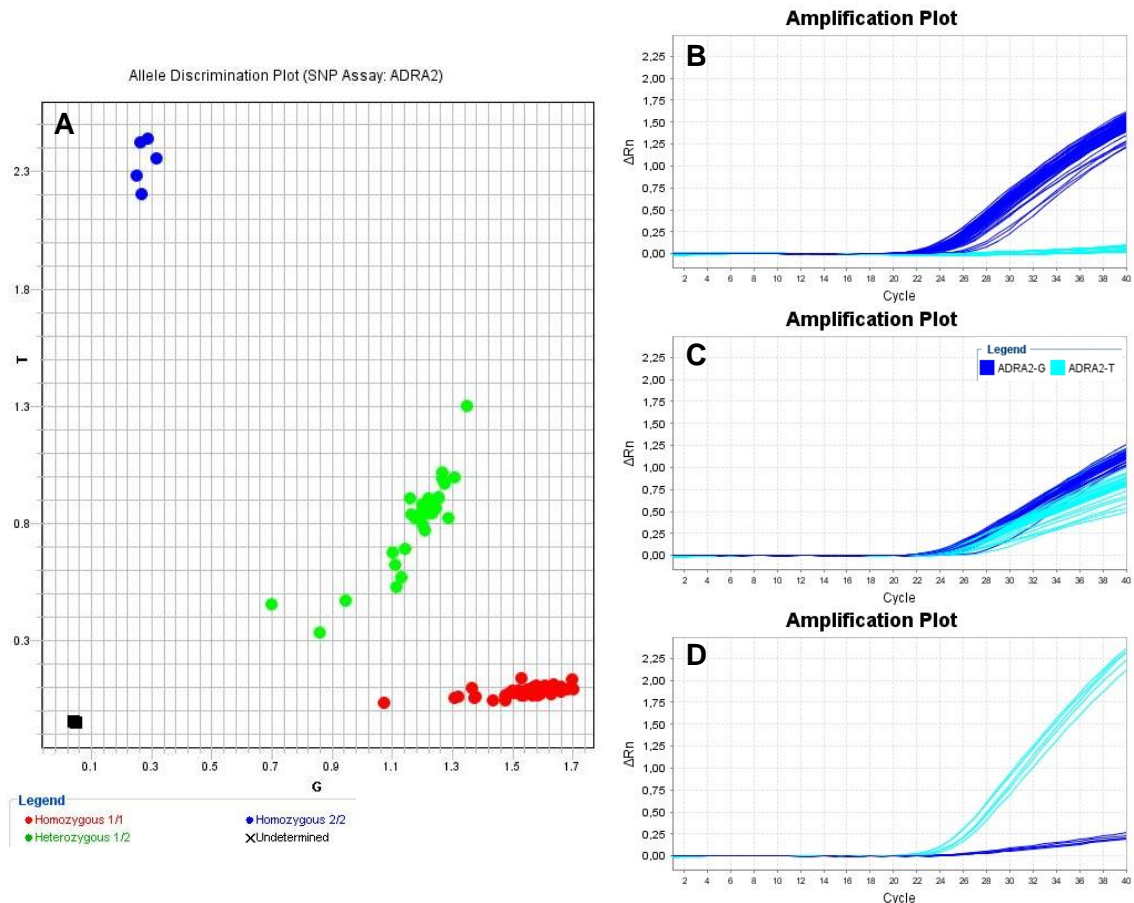
Método de extração de DNA genômico.

Modificações no método de Lahiri e Nurberger, 1991.

Etapas	Ações
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>)
2	Em tubo Eppendorf colocar 900 µL de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 µL do <i>buffy coat</i> Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 µL
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 µL de tampão de proteinase K 20 µL de proteinase K 10 µL de SDS 20% 120 µL de água ultra pura Homogeneizar em vortex Colocar em banho-maria 65 °C por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 µL de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 µL de etanol absoluto Homogeneizar por inversão Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 µL de etanol 70% Homogeneizar em vortex Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 µL de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 °C

ANEXO 6

Detecção do polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A*

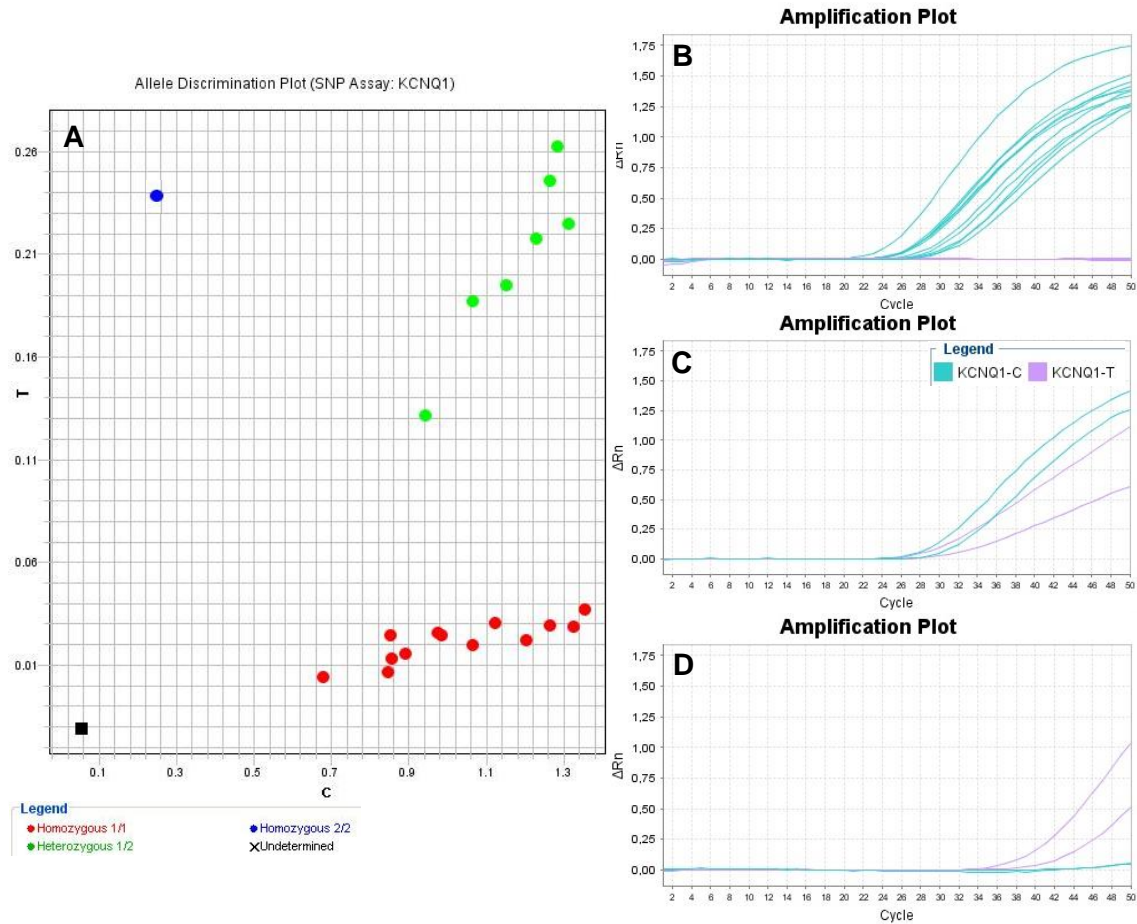


PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *ADRA2A* (rs10885122).

- A- Discriminação alélica. Em vermelho estão amostras homozigotas usuais (genótipo GG); em verde, amostras heterozigotas (genótipo GT) e em azul, amostras homozigotas raras (genótipo TT).
- B- Amplificação dos alelos: Genótipo GG. Verifica-se a amplificação somente do alelo G (azul escuro).
- C- Amplificação dos alelos: Genótipo GT. Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, G e T.
- D- Amplificação dos alelos: Genótipo TT. Verifica-se a amplificação somente do alelo T (azul claro).

ANEXO 7

Detecção do polimorfismo rs2237892 do gene *KCNQ1*

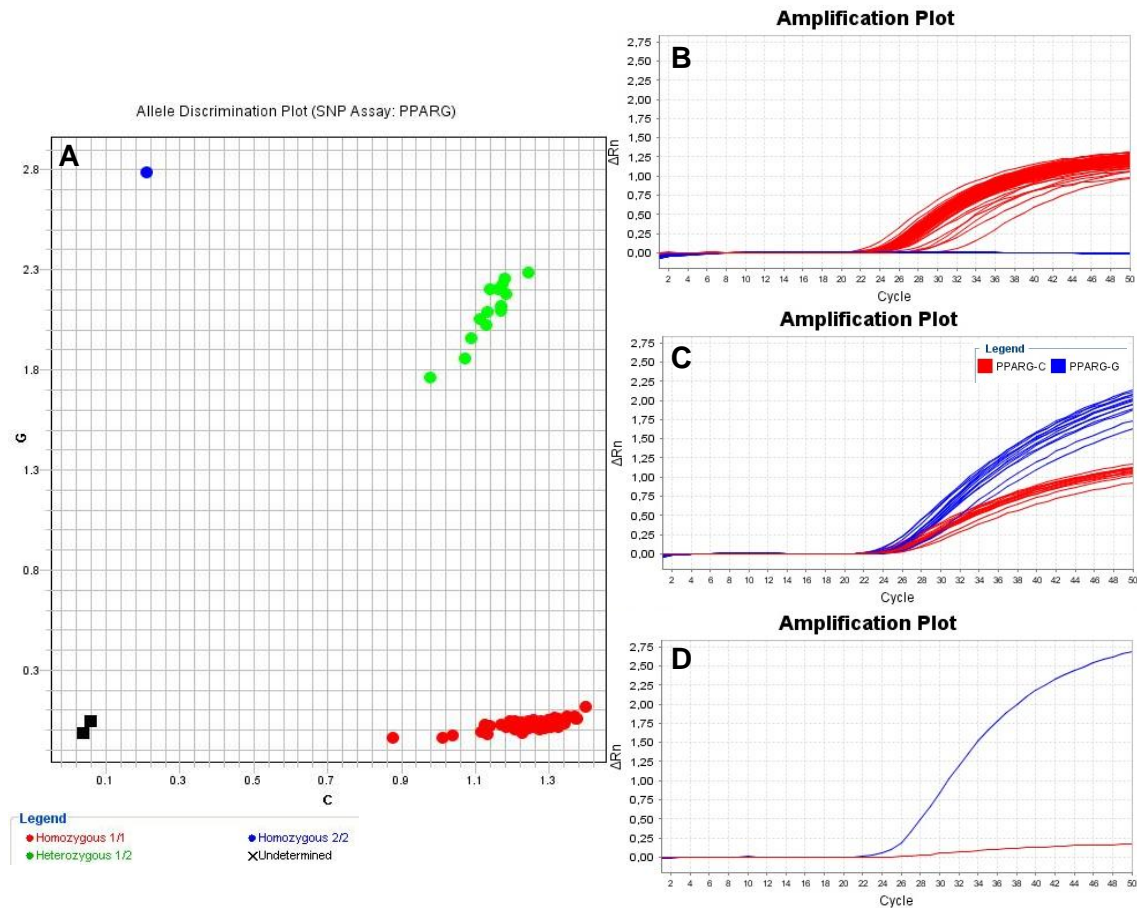


PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *KCNQ1* (rs2237892).

- A- Discriminação alélica. Em vermelho estão amostras homozigotas usuais (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CT) e em azul, amostras homozigotas raras (genótipo TT).
- B- Amplificação dos alelos: Genótipo CC. Verifica-se a amplificação somente do alelo C (azul claro).
- C- Amplificação dos alelos: Genótipo CT. Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, C e T.
- D- Amplificação dos alelos: Genótipo TT. Verifica-se a amplificação somente do alelo T (roxo).

ANEXO 8

Detecção do polimorfismo rs1801282 do gene *PPARg*

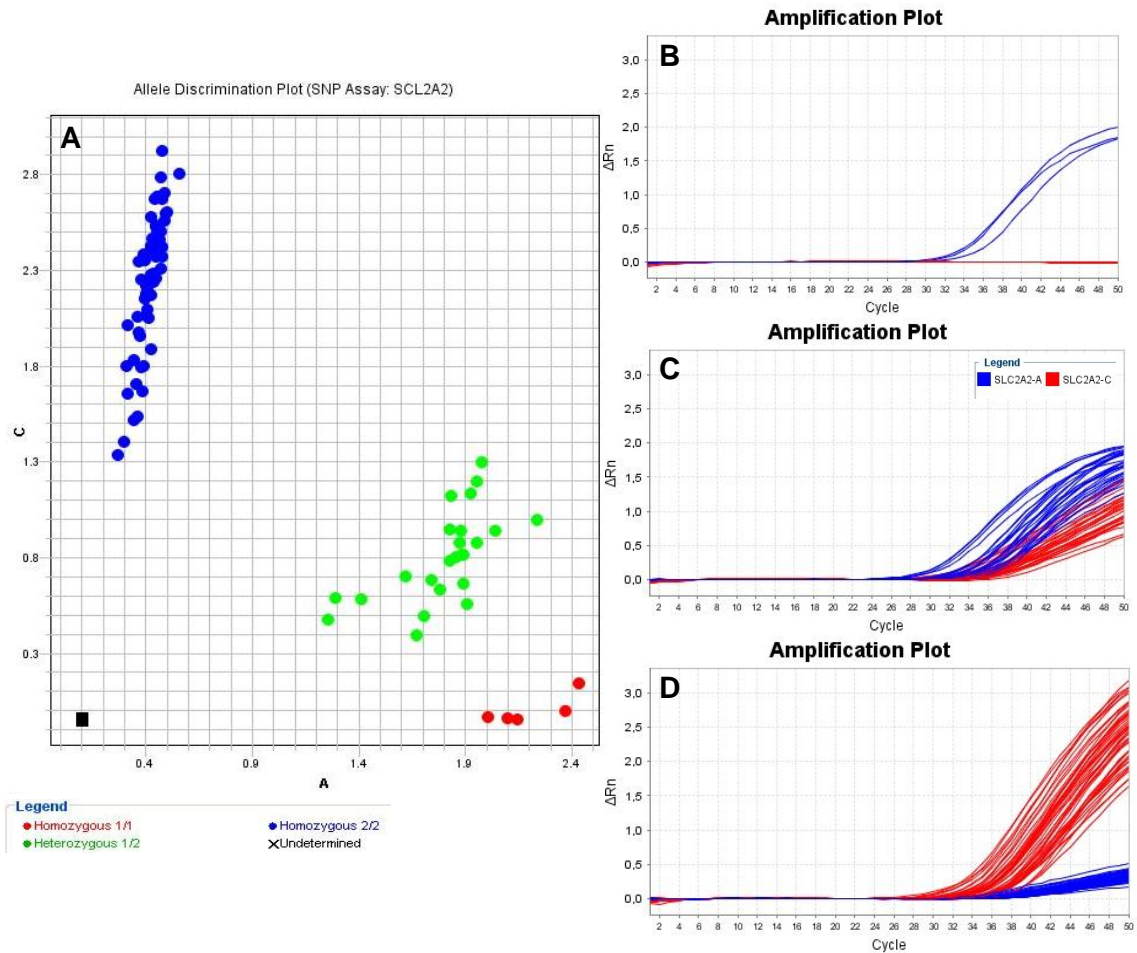


PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *PPARg* (rs1801282).

- A- Discriminação alélica. Em vermelho estão amostras homozigotas usuais (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CG) e em azul, amostras homozigotas raras (genótipo GG).
- B- Amplificação dos alelos: Genótipo CC. Verifica-se a amplificação somente do alelo C (vermelho).
- C- Amplificação dos alelos: Genótipo CG. Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, C e G
- D- Amplificação dos alelos: Genótipo GG. Verifica-se a amplificação somente do alelo G (azul).

ANEXO 9

Detecção do polimorfismo rs5393 do gene *SLC2A2*

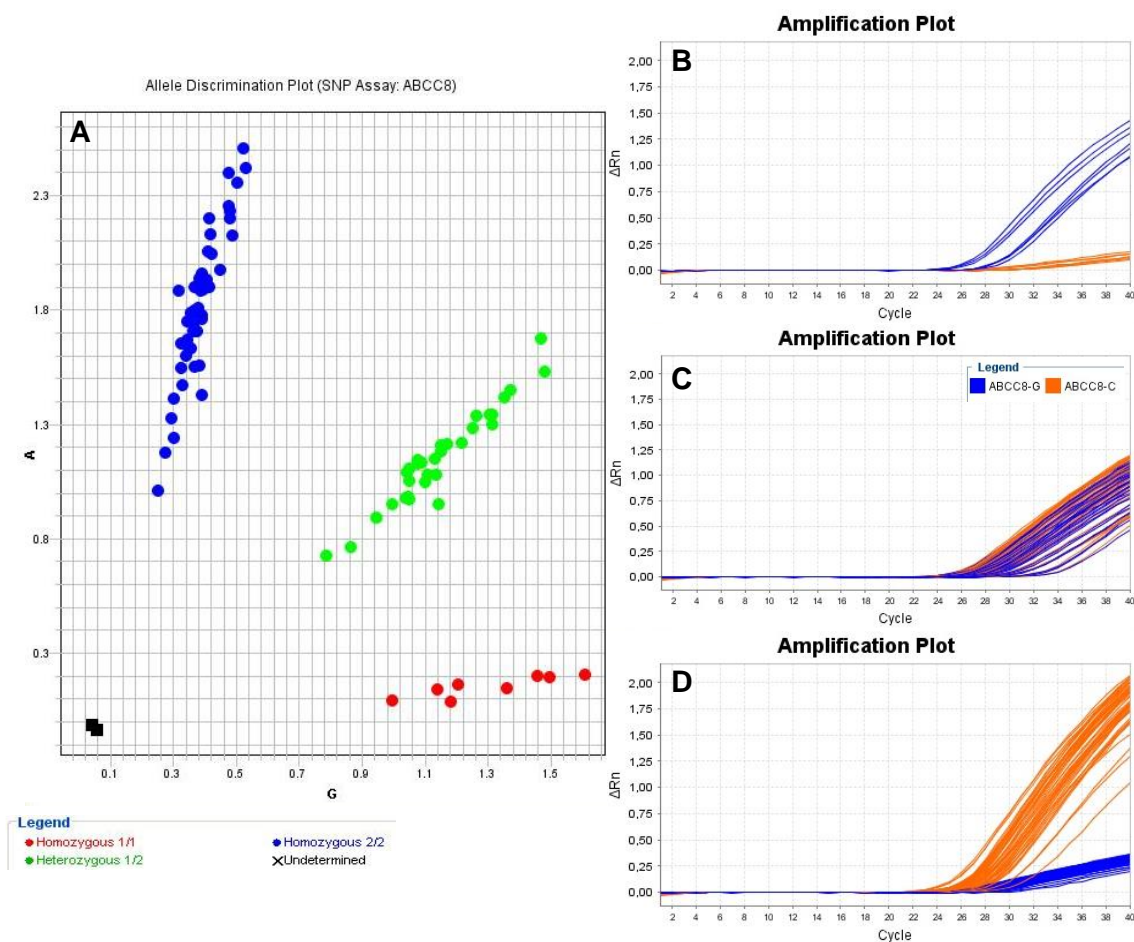


PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *SLC2A2* (rs5393).

- A- Discriminação alélica. Em vermelho estão amostras homozigotas usuais (genótipo AA); em verde, amostras heterozigotas (genótipo AC) e em azul, amostras homozigotas raras (genótipo CC).
- B- Amplificação dos alelos: Genótipo AA. Verifica-se a amplificação somente do alelo A (azul).
- C- Amplificação dos alelos: Genótipo AC. Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, A e C.
- D- Amplificação dos alelos: Genótipo CC. Verifica-se a amplificação somente do alelo C (vermelho).

ANEXO 10

Detecção do polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8*

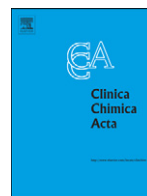


PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *ABCC8* (rs3758947).

- A- Discriminação alélica. Em vermelho estão amostras homozigotas usuais (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CT) e em azul, amostras homozigotas raras (genótipo TT).
- B- Amplificação dos alelos: Genótipo CC. Verifica-se a amplificação somente do alelo C (azul).
- C- Amplificação dos alelos: Genótipo CT. Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, C e T.
- D- Amplificação dos alelos: Genótipo TT. Verifica-se a amplificação somente do alelo T (alaranjado).

ANEXO 11

Artigo “The plasma logarithm of triglyceride/HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy”



The plasma logarithm of the triglyceride/HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy

Izabella C.R. dos Santos-Weiss^a, Rosângela R. Réa^b, Cyntia M.T. Fadel-Picheth^a, Fabiane G.M. Rego^a, Fábio de O. Pedrosa^c, Philippe Gillery^d, Emanuel M. Souza^c, Geraldo Picheth^{a,*}

^a Department of Medical Pathology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

^b Endocrinology and Metabolism Service (SEMPR), Clinical Hospital, Curitiba, Parana, Brazil

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil

^d Medicine Faculty, University of Reims, Reims, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2012

Received in revised form 12 November 2012

Accepted 7 December 2012

Available online 20 December 2012

Keywords:

Lipid profile

Gestational diabetes

Pregnancy

Triglycerides

AIP index

ABSTRACT

Background: The plasma lipid profile changes atherogenically during normal pregnancy. Gestational diabetes mellitus (GDM) can exacerbate the changes in metabolism. The logarithm of the ratio triglycerides/HDL-cholesterol is an atherogenic index of the plasma (AIP) and can be used as a marker for plasma atherogenicity.

Methods: Serum of 576 unrelated Euro-Brazilian pregnant women was collected and the subjects were classified as healthy pregnant women (control, n = 288) and gestational diabetic patients (GDM, n = 288) according to the ADA 2010 criteria. Both studied groups were sub classified in 4 gestational periods: (i) 12–23, (ii) 24–28, (iii) 29–32 and (iv) > 32 weeks of gestation.

Results: Except for the AIP, the other parameters showed low discrimination between control and GDM groups (ROC curves). When analyzed by ROC curves the AIP of subjects in the early period of gestation showed sensitivity and specificity of 82.6% and 83.4%, respectively, with a cut-off point of 0.099 (AUC 0.886, P < 0.0001).

Conclusions: The AIP is a valuable index to identify pregnant women with low risk of gestational diabetes before 24 weeks of gestation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lipid metabolism is essential for a healthy pregnancy development [1]. Fatty acids are an important source of energy and a key element for membrane synthesis while cholesterol is used to synthesise steroid hormones and is also an essential component in cellular membranes [1]. The plasma lipid profile represented by the levels of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides changes atherogenically during normal pregnancy [2,3]. A lipid profile that mimics the pathologic findings of the metabolic syndrome is a common finding during the second half of pregnancy [4–8]. However the mechanisms underlining such alterations of the lipid metabolism are not fully understood [5].

Pregnancy also produces transient insulin resistance, characterized by elevated postprandial glycemia, fasting lipidemia (increased triglycerides), LDL particles, and free fatty acids [6]. These changes do not reflect a pathological condition, but they represent a necessary adaptation of the mother's physiology to balance the energy demand of the fetus and to prepare the maternal organism for delivery and lactation [1].

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as any degree of glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy [9]. Women with GDM have a higher risk for later development of type 2 diabetes [10]. The aforementioned changes in metabolism are aggravated when the pregnancy is complicated by gestational diabetes, including alterations in fasting and postprandial glycemia, and lipids [11]. These findings suggest that GDM is a transient manifestation of long-standing metabolic dysfunction [6].

Dobiasová et al. and others showed that the logarithm of the ratio of triglycerides/HDL-cholesterol, defined as the atherogenic index of the plasma (AIP), correlated with the lipoprotein particle size and could be used as a marker for plasma atherogenicity [12,13]. The AIP index was more sensitive than the lipid profile or others indexes such as Castelli I and II. Since high serum levels of triglycerides (> 2.82 mmol/l) and low HDL-cholesterol (< 0.90 mmol/l) are associated with pre-diabetes and diabetes in asymptomatic adult subjects [14], AIP has the potential to identify these lipid alterations with high sensitivity, since the increase in triglyceride levels is often associated with reduction in HDL-cholesterol.

2. Material and methods

Serum of 576 unrelated Euro-Brazilian pregnant women was collected and stored at –20° for ≤ 2 months before analysis. This work

* Corresponding author at: Department of Medical Pathology, Federal University of Parana, Curitiba, Parana, Brazil. Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 80210-170 Curitiba, PR, Brazil. Tel./fax: +55 41 3360 4067.

E-mail address: gpicheth@ufpr.br (G. Picheth).

Table 1
Clinical and laboratory parameters of the studied groups.

Parameters	Control n = 288	GDM n = 288	P
Age, y	32.5 (28.0–34.0)	33.1 (30.0–37.0)	NS*
BMI (kg/m ²)	26.1 ± 4.7	33.4 ± 6.4	<0.001
Hypertension (%)	3.5	14.7	<0.001**
Fasting glucose (mmol/l)	4.7 (4.4–4.9)	5.2 (4.8–5.6)	<0.001*
HbA1C (%)	–	5.7 (5.3–6.1)	–
Creatinine (μmol/l)	70.4 (61.6–79.2)	60.9 (52.8–61.6)	<0.001*
Uric acid (μmol/l)	212.4 (182.9–236.0)	266.7 ± 58.2	<0.001*
TC (mmol/l)	5.1 ± 1.2	5.9 ± 1.2	<0.001
HDL-C (mmol/l)	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.3	0.042
LDL-C (mmol/l)	2.9 (2.5–3.7)	3.3 (2.6–3.8)	0.033*
TG (mmol/l)	1.2 (0.9–1.6)	2.5 (2.0–3.1)	<0.001*
non HDL-C (mmol/l)	3.6 (2.9–4.4)	4.4 (3.7–5.2)	<0.001*
CT/HDL-C ratio	3.6 (3.0–4.5)	4.1 (3.4–4.9)	<0.001*
LDL-C/HDL-C ratio	2.1 (1.6–2.9)	2.3 (1.7–2.8)	NS*
AIP	−0.04 ± 0.21	0.250 ± 0.19	<0.001

Values are mean ± SD; median (IQR) or %.

AIP, atherogenic index of the plasma is the log (TG/HDL-C) ratio; BMI, body mass index; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol; TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Hypertension (blood pressure: systolic > 140 mm Hg or diastolic > 90 mm Hg). P-value, t-test for independent variables; *Mann–Whitney U test or **χ² test.

was a matched case–control study and the subjects were classified as healthy pregnant women (control group, n = 288) and gestational diabetic patients (GDM, n = 288) according to the American Diabetes Association (ADA) 2010 criteria. More recently GDM is defined as diabetes diagnosed during pregnancy that is not clearly overt diabetes. High-risk women found to have diabetes at initial prenatal are diagnosed to have overt diabetes [15]. The University's Human Research Ethics Committee approved this study and the patients have assigned the informed consent.

Both studied groups were matched by age and further classified according to the gestational weeks in four periods: (i) 12–23 weeks pregnant women, (ii) 24–28 weeks, (iii) 29–32 weeks, and (iv) > 32 weeks of gestation. GDM patients and healthy subjects were not under medication.

The analytes (mean, CV) were total cholesterol (3.9 mmol/l; CVa = 2.1%), HDL-cholesterol (1.1 mmol/l; CVa = 4.3%), triglycerides (1.2 mmol/l; CVa = 2.6%), fasting glucose (4.9 mmol/l; CVa = 2.4%), creatinine (97.2 μmol/l; CVa = 4.9%), uric acid (315 μmol/l; CVa = 2.2%) and glycated haemoglobin (HbA1C, 5.3%; CVa = 2.8%). All tests were performed in the automated system Architect Ci8200 (Abbott Diagnostic Laboratory, Brazil) with reagents, calibrators and controls from the manufacturer. The LDL-cholesterol was estimated by the Friedewald equation [16]. The ratios TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C (Castelli I and II indices, respectively) [17] and the non-HDL cholesterol concentration were also determined. The AIP was calculated as the logarithm of the ratio triglycerides/HDL-cholesterol, both expressed in mmole/l [12].

Table 2
Biochemical parameters of healthy and gestational diabetic pregnant women at different gestational periods.

Control, n = 288						GDM, n = 288				
Weeks of gestation	12–23	24–28	29–32	> 32	P	12–23	24–28	29–32	> 32	P
Glucose, mmol/L	4.7 (4.4–4.9)	4.7 (4.4–4.9)	4.5 (4.4–4.8)	4.5 (4.2–4.7)	NS	6.7 (6.1–7.9)	5.5 (4.9–6.3)	5.1 (4.7–5.7)	5.1 (4.7–5.6)	<0.001
TC, mmol/L	4.8 ± 0.9	5.9 ± 1.2	6.2 ± 1.3	6.3 ± 1.3	<0.001	5.0 ± 1.0	5.6 ± 1.2	5.9 ± 1.3	6.2 ± 1.2	0.001
HDL-C, mmol/L	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.5	0.017	1.2 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.003
LDL-C, mmol/L	2.8 (2.3–3.2)	3.7 (2.9–4.3)	3.6 (2.7–3.9)	3.5 (2.9–4.0)	<0.001	2.5 (1.8–3.0)	2.6 (2.3–3.6)	3.2 (2.6–4.0)	3.5 (2.8–3.9)	0.009
TG, mmol/L	1.1 (0.9–1.4)	1.7 (1.3–2.1)	1.9 (1.4–2.4)	2.0 (1.4–2.2)	<0.001	2.5 (2.0–3.2)	2.2 (1.8–2.7)	2.5 (2.0–3.1)	2.7 (2.3–3.4)	0.004
TC/HDL-C ratio	3.3 (2.9–4.0)	3.6 (3.1–4.4)	3.9 (3.2–5.2)	3.8 (3.1–4.2)	0.004	3.7 (3.4–5.2)	3.6 (2.9–4.1)	4.1 (3.4–4.5)	4.4 (3.7–4.9)	0.012
AIP	−0.07 ± 0.19	0.05 ± 0.17	0.10 ± 0.17	0.15 ± 0.24	<0.001	0.28 ± 0.24	0.21 ± 0.19	0.22 ± 0.17	0.30 ± 0.17	0.005

Sample sizes are 72 subjects in each period of gestation. Each subgroup is matched by age.

Data are mean ± SD or median (interquartile range).

AIP, atherogenic index of the plasma, log(TG/HDL-C) ratio; TC, total cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; LDL-C, LDL-cholesterol, TG, triglycerides; TC/HDL-C, total cholesterol/HDL-C ratio.

P-value Kruskal–Wallis ANOVA comparing the four studied periods for control and GDM groups.

A P-value < 0.05) was considered significant.

2.1. Statistical analysis

The distribution of all substrates analyzed was tested for normality by the Kolmogorov–Smirnov test. Variables with normal distribution were reported as mean ± SD and those with non-normal distribution as median (interquartile range, 25%–75%). Comparisons among groups with continuous variables were tested with the Student-t test, Kruskal–Wallis or the Mann–Whitney U test as appropriate. Discrete variables were compared by the chi-square test. A P-value < 0.05) was considered significant. The program Statistica for windows version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa OK) was used for analysis. ROC (Receiver Operating Characteristics) curves, cut-off points and area under the curve (AUC) were calculated using MedCalc ver 12.2.1.0 (Mariakerke, Belgium).

3. Results

The clinical and laboratory characteristics of healthy and diabetic pregnant patients are shown in Table 1. The groups were matched by age and only the ratio LDL-C/HDL-C was not different between the groups. In the diabetic group the serum lipid profile changes in an atherogenic pattern. Fasting glucose and HbA1C suggested that GDM patients showed good glycemic control (median HbA1C < 6.5%) and no indication of kidney damage accessed by creatinine levels (< 88 μmol/l).

Healthy pregnant women showed no significant difference of fasting glucose levels in the 4 gestational period groups studied (Table 2). In contrast, GDM patients had higher levels of fasting glucose levels which were significantly different in the four gestational periods studied, with patients at 12–23 weeks gestation showing the highest levels of fasting glucose (Table 2). The AIP was capable of discriminating between healthy and GDM subjects especially in the early period of gestation (12–23 weeks), as shown in Fig. 1.

Analyses of the ROC curves showed that the AIP of women in the 12 to 23 weeks of gestation have a sensitivity and specificity of 82.6% and 83.4%, respectively, with a cut-off point of 0.099 (AUC 0.886, P < 0.0001) as shown in Fig. 2. For the other gestational periods the AUC is progressively reduced as the sensitivity and specificity (Fig. 3, supplemental material). The triglyceride concentration was a good discriminator for GDM, but its discrimination power is lower than that of AIP. The other parameters showed low discrimination power between the Control and GDM groups accessed by ROC curves (Fig. 4, supplemental material).

4. Discussion

The evaluation of laboratory parameters during normal pregnancy is complex since changes in several hormone levels to promote the fetus viability occur during pregnancy [8,19] resulting in metabolic alterations. In the presence of gestational diabetes these changes are

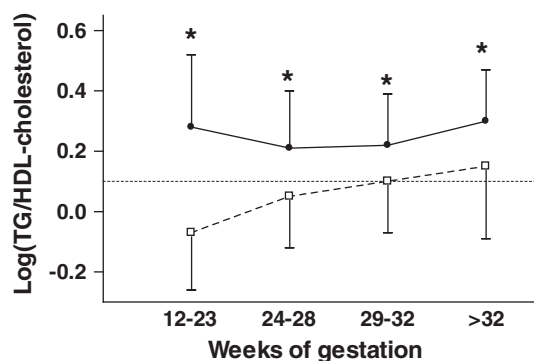


Fig. 1. Atherogenic index of the plasma (AIP) in different periods of gestation in healthy and diabetic women. The atherogenic index of the plasma (AIP) is the $\log(\text{triglycerides}/\text{HDL-cholesterol})$. Healthy pregnant women are shown as open squares and dotted line while gestational diabetic patients are represented by closed circles and solid line. The AIP value of 0.099 (dotted line) was the cut-off that best discriminates the groups in the first gestational period studied (12–23 weeks). *P-value < 0.001 for mean comparisons in each period.

more accentuated [3,8,20–23]. The difference in routine biochemical parameters between healthy and GDM patients such as those reported in Table 1 are expected [1,3,5,24]. The atherogenic index of the plasma (AIP) is a surrogate of small LDL particle size [24]. AIP has been associated with insulin resistance [25–27] and metabolic syndrome [22], as a predictor of atherosclerosis [12,13] and dyslipidaemia [28]. Also Li et al. [29] showed that AIP is a useful indicator for insulin resistance across racial/ethnic subpopulations.

Since high levels of triglycerides are associated with gestational diabetes [11], and HDL-cholesterol does not change significantly during gestation even in GDM patients [5,8] we hypothesized that AIP could be a good predictor of diabetes in pregnancy. This index combines triglyceride levels that rise expressively in GDM, and HDL-cholesterol, that is more stable and tends to normalize the ratio among the subjects. Only few studies report the use of AIP in pregnant patients and to our knowledge none has investigated the ability of AIP to predict the onset of GDM.

The mean AIP values of GDM patients of the four gestational periods were significantly different ($P < 0.001$) when compared with

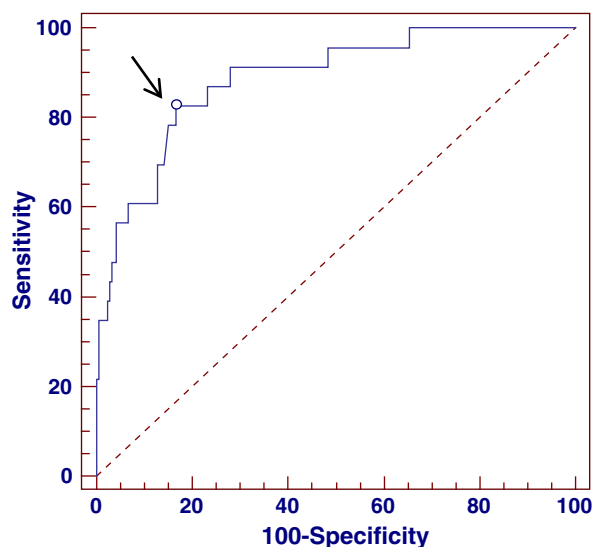


Fig. 2. ROC curve for AIP values in pregnant women with and without gestational diabetes at 12–23 weeks of gestation. The AUC is 0.886 ± 0.036 . The arrow indicates the cut-off point (0.099) with sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value, of 82.6%, 83.4%, 35.2% and 97.8% respectively.

healthy pregnant women (Fig. 1). We also observed that the highest difference between the two groups of pregnant women was in the early stages of gestation (12 to 23 weeks). Analyses of the ROC curves established the best cut-off point to separate these two groups (Fig. 2). At 12–23 weeks of gestation the AIP cut-off of 0.099 showed a negative predictive value of 97.8% with sensitivity and specificity of 82.6% and 83.4%, respectively. The high negative predictive value suggests that pregnant women with AIP below the cut-off have low probability of GDM in early pregnancy.

Compared to AIP, triglycerides levels alone and others routine markers for cardiovascular risk showed low discriminant capacity (Fig. 4, supplemental material).

The relatively small sample size in this study could affect the results or cut-off value. Li et al. [29] studied the triglyceride/HDL-cholesterol ratio as an indicator for insulin resistance in non-Hispanic whites, non-Hispanic blacks and Mexican-Americans. These authors showed that this ratio could be used in all 3 racial/ethnic groups studied. Thus it is likely that AIP is a reliable marker for GDM in different ethnic populations. The concentration of triglycerides and HDL-cholesterol found in this study were similar to other works previously published [1,5,30,32]. These findings reinforce that AIP is able to discriminate between GDM and healthy pregnant women.

The guidelines recommend that the screening and diagnosis for GDM should be performed between the 24th and 28th week of gestation [18]. In addition only women with high risk of diabetes should be tested on the first prenatal visit since it may be difficult in some cases to differentiate undiagnosed pre-existing diabetes from GDM [18].

Although the measurement of triglycerides in pregnant women is not a consensus [31], it has been suggested that GDM women may develop hypertriglyceridemia in early stages of pregnancy [8,31], and that the triglyceride levels are higher in preeclampsia in early pregnancy [11]. Furthermore, the triglycerides levels of GDM patients have been associated with fetal fat mass and neonatal body weight [33–35].

Now we show that the AIP index may be a helpful tool to identify low risk patients for GDM. Therefore, we propose that the measurement of lipid profile and calculation of AIP, which are low cost and routine clinical laboratory analyses, should be added to the determination of fasting glucose in the early stages of gestation. Thus, the glycemic parameters of pregnant women with less than 24 weeks of gestation and AIP > 0.099 should be closely followed. Furthermore, population studies with larger sample size should be carried out to establish more accurate cutoff values for AIP at different gestational periods, and the relationship of AIP with traditional markers for GDM.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.004>.

Acknowledgments

We thank Dr M. G. Yates for reading the manuscript and for suggestions. This work was supported by CNPq and Fundação Araucária. No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

References

- [1] Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, et al. Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005;22: 21–5.
- [2] Chiang AN, Yang ML, Hung JH, Chou P, Shyn SK, Ng HT. Alterations of serum lipid levels and their biological relevances during and after pregnancy. *Life Sci* 1995;56: 2367–75.
- [3] Toescu V, Nuttall SL, Martin U, et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci* 2004;106:93–8.
- [4] Martin U, Davies C, Hayavi S, Hartland A, Dunne F. Is normal pregnancy atherogenic? *Clin Sci* 1999;96:421–5.
- [5] Wiznitzer A, Mayer A, Novack V, et al. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational diabetes mellitus: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol* 2009;201:482e1–8.

- [6] Carpenter MW. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease. *Diabetes Care* 2007;30(Suppl. 2):S246–50.
- [7] Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care* 2002;25:1862–8.
- [8] Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1256S–61S.
- [9] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33(Suppl. 1):S62–9.
- [10] Min Y, Nam JH, Ghebremeskel K, Kim A, Crawford M. A distinctive fatty acid profile in circulating lipids of Korean gestational diabetics: a pilot study. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;73(2):178–83.
- [11] McGrowder D, Grant K, Irving R, et al. Lipid profile and clinical characteristics of women with gestational diabetes mellitus and preeclampsia. *JMB* 2009;28:72–81.
- [12] Dobiasová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER_{HDL}). *Clin Biochem* 2001;34:583–8.
- [13] Tan MH, Johns D, Glazer NB. Pioglitazone reduces atherogenic index of plasma in patients with type 2 diabetes. *Clin Chem* 2004;50:1184–8.
- [14] American Diabetes Association. Standards in medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(Suppl. 1):S13–61.
- [15] American Diabetes Association. Standards in medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2012;35(Suppl. 1):S11–63.
- [16] Friedwald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–552.
- [17] Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PWF, Abbot RD, Kalousdian S, Kannel WN. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: the Framingham Heart Study. *JAMA* 1986;256:2835–8.
- [18] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012;35(Suppl. 1):S64–71.
- [19] Hadaegh F, Hatami M, Tohidi M, Sarbakhsh P, Saadat N, Azizi F. Lipid ratios and appropriate cut off values for prediction of diabetes: a cohort of Iranian men and women. *Lipids Health Dis* 2010;9:85.
- [20] Ordovas JM, Pocovi M, Grande F. Plasma lipids and cholesterol esterification rate during pregnancy. *Obstet Gynecol* 1984;63:20.
- [21] Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, Luthy DA. Early pregnancy lipid concentrations and the risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;70:134–42.
- [22] Lauenborg J, Mathiesen E, Hansen T, et al. The prevalence of the metabolic syndrome in a Danish population of women with previous gestational diabetes mellitus is three-fold higher than in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4004–10.
- [23] AbouGhalia AH, Khater LM, El-Wahed MAA, El-Bradrawy MF. Lipoprotein (a) and lipid profile in neonates from mother with three different types of diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2003;37:563–9.
- [24] Qiu C, Rudra C, Austin MA, Williams MA. Association of gestational diabetes mellitus and low-density lipoprotein (LDL) particle size. *Physiol Res* 2007;56:571–8.
- [25] Onat A, Can G, Kaya H, Hergenç G. “Atherogenic index of plasma” (log₁₀ triglyceride/high-density lipoprotein-cholesterol) predicts high blood pressure, diabetes, and vascular events. *J Clin Lipidol* 2010;4:89–98.
- [26] Hannon TS, Bacha F, Lee SJ, Janosky J, Arslanian SA. Use of markers of dyslipidemia to identify overweight youth with insulin resistance. *Pediatr Diabetes* 2006;7:260–6.
- [27] McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, Chu J, Lamendola C, Reaven G. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 2003;139:802–9.
- [28] Soska V, Fiala J, Nebeska K, Jarkovsky J, Hrubá D. The atherogenic index of plasma is increased by hormonal contraception. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71:94–100.
- [29] Li C, Ford ES, Meng YX, Mokdad AH, Reaven GM. Does the association of triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio with fasting serum insulin differ by race/ethnicity? *Cardiovasc Diabetol* 2007;7:4.
- [30] Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:938–49.
- [31] Van den Elzen HJ, Wladimiroff JW, Cohen-Overbeek TE, de Bruijn AJ, Grobbee DE. Serum lipids in early pregnancy and risk of pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:117–22.
- [32] Ray JG, Diamond P, Singh G, Bell CM. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113:379–86.
- [33] Herrera E, Ortega-Senovilla H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy – are these the cause of the problem? *Clin Endocrinol Metab* 2010;24:515–25.
- [34] Kitajima M, Oka S, Yasuhi I, Fukuda M, Rii Y, Ishimaru T. Maternal serum triglyceride at 24–32 weeks’ gestation and newborn weight in nondiabetic women with positive diabetic screens. *Obstet Gynecol* 2001;97:776–80.
- [35] Knopp RH, Magee MS, Walden CE, Bonet B, Benedetti TJ. Prediction of infant birth weight by GDM screening tests. Importance of plasma triglyceride. *Diabetes Care* 1992;15:1605–13.

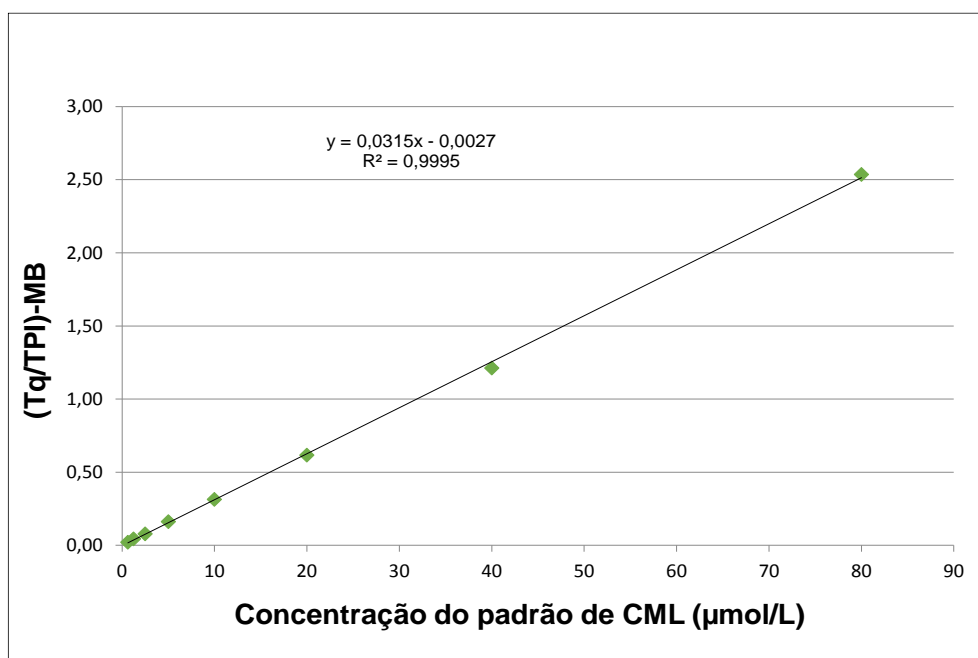
ANEXO 12

Exemplo para o cálculo da concentração de AGEs

Dados brutos e cálculos realizados para a obtenção da concentração dos produtos de glicação avançada: CML (o mesmo procedimento foi adotado para os demais AGEs analisados)

CML ($\mu\text{mol/L}$)	Amostras	Tq	Tc	TPI	Tq/PI	Tq/Tc	(Tq/TPI)-MB	Recup.	Conc. ($\mu\text{mol/L}$)
	MB1	5,96E+03	8,79E+03	1,24E+05	0,05	0,68			
	MB2	5,07E+03	6,72E+03	1,24E+05	0,04	0,75			
0,625	P1	8,19E+03	1,10E+04	1,29E+05	0,06	0,74	0,02	128,51	
1,25	P2	1,00E+04	1,39E+04	1,16E+05	0,09	0,72	0,05	121,96	
2,5	P3	1,63E+04	2,19E+04	1,36E+05	0,12	0,74	0,08	103,70	
5	P4	2,61E+04	3,50E+04	1,28E+05	0,20	0,75	0,16	105,22	
10	P5	4,48E+04	6,01E+04	1,26E+05	0,36	0,75	0,31	100,75	
20	P6	8,96E+04	1,14E+05	1,36E+05	0,66	0,79	0,62	98,51	
40	P7	1,97E+05	2,50E+05	1,57E+05	1,25	0,79	1,21	96,55	
80	P8	3,17E+05	4,04E+05	1,23E+05	2,58	0,78	2,54	100,76	
	72 DG	4,71E+04	9,02E+04	9,20E+04	0,51	0,52			16,34
	73 DG	4,16E+04	6,77E+04	1,03E+05	0,40	0,61			12,91
	75 DG	4,12E+04	7,15E+04	9,31E+04	0,44	0,58			14,13
	76 DG	4,00E+04	6,73E+04	1,02E+05	0,39	0,59			12,54
	77 DG	3,76E+04	5,55E+04	9,81E+04	0,38	0,68			12,25
	78 DG	4,68E+04	6,61E+04	1,01E+05	0,46	0,71			14,80
									13,83

*MB= matriz branca; TPI= transição do padrão interno; Tq= transição de quantificação; Tc= transição de confirmação



Cálculo para a amostra 72DG:

Equação da reta:

$$y = ax - b$$

$$y = 0,0315x - 0,0027$$

$$\text{Para calcular a concentração de CML} = \frac{((Tq/TPI) + 0,0027)}{0,0315}$$

$$\text{Concentração de CML} = \frac{(0,512 + 0,0027)}{0,0315}$$

$$\text{Concentração de CML} = \frac{0,5147}{0,0315}$$

$$\text{Concentração de CML} = 16,34 \mu\text{mol/L}$$

A concentração de CML, bem como dos demais AGEs analisados, foi normalizada através da concentração de lisina, como apresentado abaixo.

$$\text{Concentração final de CML (mmol/mol de lisina)} = \frac{\text{CML } (\mu\text{mol/L})}{\text{Lisina (mmol/L)}}$$

Amostras	CML ($\mu\text{mol/L}$)	Lis (mmol/L)	CML/Lis (mmol/mol)
72 DG	16,34	89,70	0,182
73 DG	12,91	77,46	0,167
75 DG	14,13	80,12	0,176
76 DG	12,54	71,60	0,175
77 DG	12,25	96,43	0,127
78 DG	14,80	90,45	0,164
Média	13,83	84,29	0,165